

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE L'IMPACT DE LA CONSOMMATION MÉDICAMENTEUSE SUR  
LA TOXICOCINÉTIQUE DU TRICHLORÉTHYLÈNE

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR

MOUNA CHEIKH ROUHOU

SEPTEMBRE 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»



## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon directeur de recherche Monsieur Sami Haddad, Ph.D., professeur à l'université de Montréal et professeur associé au département des sciences biologiques à l'Université du Québec à Montréal (UQÀM), pour ses précieux conseils et directives, ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée et les moyens qu'il a mis à ma disposition.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance et ma considération au Professeur Philip Spear, Ph.D., mon co-directeur de recherche, pour son assistance et son suivi.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Robert Tardif, Ph.D., professeur à l'université de Montréal et Madame Lucie Lamontagne, Ph.D., professeur à l'Université du Québec à Montréal (UQÀM) qui ont accepté d'être parmi les membres du jury d'évaluation de ce doctorat.

Je tiens aussi à remercier très sincèrement Madame Isabelle Rheault et Madame Ginette Charest-Tardif pour leur précieuse aide dans la réalisation de ce doctorat.

Finalement, je ne saurais oublier le soutien et les encouragements de ma famille et de mon conjoint.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	VII
LISTE DES TABLEAUX .....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XI
RÉSUMÉ .....	XIV
PROBLÉMATIQUE.....	1
INTRODUCTION .....	4
0.1 Le trichloréthylène .....	4
0.1.1 Caractéristiques du trichloréthylène .....	4
0.1.2 Applications du trichloréthylène.....	6
0.1.3 Toxicité du trichloréthylène .....	7
0.1.4 Cinétique du trichloréthylène.....	9
0.2 La consommation médicamenteuse.....	17
0.3 Hypothèses d'interactions toxicocinétiques entre le TCE et les médicaments sélectionnés .....	20
0.4 Mode d'action et métabolisme des médicaments choisis.....	22
0.4.1 Les anti-inflammatoires.....	22
0.4.2 Les antibiotiques .....	33
0.4.3 Les antidiabétiques.....	37
0.4.4 Les antihistaminiques.....	39
0.4.5 Les anticonvulsivants.....	43
0.5 Les interactions toxicologiques .....	52
0.5.1 Les interactions toxicodynamiques.....	52
0.5.2 Les interactions toxicocinétiques .....	54

0.6 Les interactions toxicologiques impliquant le trichloréthylène .....	59
OBJECTIFS .....	62
CHAPITRE I	
MODULATION OF TRICHLOROETHYLENE <i>IN VITRO</i> METABOLISM BY DIFFERENT DRUGS IN RATS .....	66
1.1 Introduction .....	67
1.2 Material and Methods.....	72
1.2.1 Chemicals and material .....	72
1.2.2 Assessment of metabolic interactions in rat hepatocyte suspensions .....	72
1.2.3 Confirmation and characterization of metabolic interactions .....	77
1.2.4 Chemical analysis by GC-MS .....	78
1.2.5 Data analysis and statistics.....	78
1.3 Results .....	79
1.3.1 <i>In vitro</i> identification of metabolic interactions.....	79
1.3.2 Confirmation and characterization of metabolic interactions in rat hepatic microsomes: trichloroethanol glucuronidation .....	82
1.3.3 Confirmation and characterization of metabolic interactions in rat hepatic microsomes: trichloroethylene oxidation.....	86
1.3.4 Characterization of trichloroethylene metabolism inhibition by gliclazide .....	88
1.3.5 Characterization of trichloroethylene metabolism inhibition by valproic acid.....	92
1.4 Discussion .....	95
1.5 Conclusion.....	99
1.6 Acknowledgments .....	100
CHAPITRE II	
<i>IN VITRO</i> METABOLIC INTERACTIONS BETWEEN DRUGS AND TRICHLOROETHYLENE IN HUMANS .....	102
2.1 Introduction .....	103
2.2 Material and Methods.....	108
2.2.1 Chemicals and material .....	108

2.2.2	Assessment of metabolic interactions in human hepatocyte suspensions .....	109
2.2.3	Confirmation of metabolic interactions .....	110
2.2.4	Characterization of metabolic interactions .....	110
2.2.5	Chemical analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS).....	113
2.2.6	Data analysis and statistics.....	113
2.3	Results .....	115
2.3.1	<i>In vitro</i> identification of metabolic interactions.....	115
2.3.2	Confirmation and characterization of metabolic interactions in human hepatic microsomes: TCOH glucuronidation .....	115
2.3.3	Confirmation and characterization of metabolic interaction in human hepatic microsomes TCE oxidation.....	121
2.4	Discussion .....	126
2.4.1	Human-rat comparison of metabolic interaction in hepatocytes.....	130
2.4.2	Human-rat comparison of metabolic interaction in microsomes .....	133
2.5	Conclusion.....	134
2.6	Funding information:.....	135
2.7	Acknowledgments .....	136
CHAPITRE III		
IN VIVO IMPACT OF NAPROXEN, SALICYLIC ACID, AND VALPROIC ACID ON THE PHARMACOKINETICS OF TRICHLOROETHYLENE AND METABOLITES IN RATS .....		138
3.1	Introduction .....	140
3.2	Material and methods .....	144
3.2.1	Chemicals and animals .....	144
3.2.2	Exposure schemes.....	144
3.2.3	Chemical analysis of air chamber .....	145
3.2.4	Chemical analysis of biological samples .....	146
3.2.5	Data analysis and statistics.....	147
3.3	Results .....	148

3.3.1 Effect of drugs on TCE blood levels.....	148
3.3.2 Effect of drugs on $\text{TCOH}_{\text{free}}$ blood levels .....	149
3.3.3 Effect of drugs on $\text{TCOH}_{\text{total}}$ levels in blood and urine .....	150
3.3.4 Effect of drugs on TCA in blood, urine and tissues.....	152
3.4 Discussion .....	156
3.4.1 Naproxen.....	156
3.4.2 Salicylic acid.....	158
3.4.3 Valproic acid.....	159
3.5 Conclusion.....	162
3.6 Funding information.....	163
CHAPITRE IV	
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	
4.1 Discussion générale des résultats .....	164
4.2 Perspectives de développement.....	175
4.2.1 Les liaisons protéiques .....	176
4.2.2 Modélisation PBPK .....	180
4.2.3 Effet de la co-exposition chronique aux médicaments et au TCE .....	183
4.2.4 Impact sur la biosurveillance .....	185
CHAPITRE V	
CONCLUSION GÉNÉRALE	
APPENDICE A.....	190
BIBLIOGRAPHIE.....	201

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
0.1	Structure chimique du trichloréthylène ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 5
0.2	Les voies de biotransformation du trichloréthylène (Dobrev <i>et al.</i> , 2002). (*: représente les métabolites toxiques). ..... 13
0.3	Structure de l'hydrate de chloral ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 15
0.4	Structure du trichloroéthanol (TCOH) ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 16
0.5	Structure du S-(1, 2-dichlorovinyl) L-cystéine ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 16
0.6	Structure de l'acide salicylique ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 25
0.7	Structure de l'acétaminophène ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 25
0.8	Structure de l'ibuprofène ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 27
0.9	Structure du diclofénac ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 29
0.10	Structure de l'acide méfénamique ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 30
0.11	Structure du naproxène ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 32
0.12	Structure de la sulfasalazine ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 32
0.13	Structure de l'érythromycine ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 36
0.14	Structure de l'amoxicilline ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 37
0.15	Structure du gliclazide ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 39
0.16	Structure de la ranitidine ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 41
0.17	Structure de la cimétidine ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 43
0.18	Structure de l'acide valproïque ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 45
0.19	Structure de la carbamazépine ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ). ..... 47
1.1	Metabolic pathways of trichloroethylene. .... 69



1.2	Modulation of trichloroethylene biotransformation by drugs in suspended rat hepatocytes exposed to TCE. ....	82
1.3	Impact of drugs ( $10X C_{\max}$ ) on trichloroethanol metabolism in rat liver microsomes ( $n=5$ ) exposed to TCOH.....	84
1.4	Michaelis–Menten kinetics for TCOH disappearance by glucuronidation in rat liver microsomes. ....	85
1.5	Dixon plots for inhibition of TCOH glucuronidation by naproxen in rat liver microsomes. ....	87
1.6	Impact of drugs ( $10X C_{\max}$ ) on TCOH and TCA appearance following oxidation in rat liver microsomes exposed to TCE (0.01 mM). ....	88
1.7	Michaelis–Menten kinetics for TCOH appearance following oxidation in rat liver microsomes. ....	89
1.8	Michaelis–Menten kinetics for trichloroacetic acid (TCA) formation in rat liver microsomes. ....	90
1.9	Dixon plots for inhibition of trichloroethanol (TCOH) formation by gliclazide in rat liver microsomes.....	91
1.10	Dixon plots for inhibition of trichloroethanol (TCOH) formation by valproic acid in rat liver microsomes.....	93
1.11	Dixon plots for inhibition of trichloroacetic acid (TCA) formation rate by valproic acid in rat liver microsomes. ....	94
2.1	Metabolic pathways of trichloroethylene. ....	104
2.2	Modulation of trichloroethylene biotransformation by drugs in suspended human hepatocytes exposed to TCE.....	116
2.3	Impact of drugs ( $10X C_{\max}$ ) on TCOH metabolism in human liver microsome. ....	119
2.4	Michaelis–Menten kinetics for TCOH disappearance by glucuronidation in human liver microsomes.....	120
2.5	Dixon plots for inhibition of TCOH glucuronidation by naproxen in human liver microsomes. ....	121
2.6	Impact of drugs ( $10X C_{\max}$ ) on TCOH and TCA appearance following oxidation in human liver microsomes exposed to TCE (0.011 mM). ....	123
2.7	Michaelis–Menten kinetics for TCOH appearance following oxidation in human liver microsomes.....	124

2.8	Dixon plots for inhibition of trichloroethanol (TCOH) formation by carbamazepine in human liver microsomes. ....	125
2.9	Comparison of modulation profile for trichloroethanol (TCOH) formation by drugs in suspended human and rat hepatocytes exposed to TCE .....	131
2.10	Comparison of modulation profile for trichloroacetic acid (TCA) formation by drugs in suspended human and rat hepatocytes exposed to TCE.....	132
3.1	Impact of naproxen, salicylic acid, and valproic acid at 10 times the therapeutic maximum dose in human on trichloroethylene levels in blood in rat. ....	148
3.2	Impact of naproxen, salicylic acid, and valproic acid at 10 times the therapeutic maximum dose in human on free trichloroethanol levels in blood in rat.....	150
3.3	Impact of naproxen, salicylic acid, and valproic acid at 10 times the therapeutic maximum dose in human on total trichloroethanol levels in blood in rat.....	151
3.4	Impact of naproxen, salicylic acid, and valproic acid at 10 times the therapeutic maximum dose in human on trichloroacetic acid levels in blood in rat.....	152
3.5	Impact of naproxen, salicylic acid, and valproic acid at 10 times the therapeutic maximum dose in human on total trichloroethanol levels in urine in rat.....	153
3.6	Impact of naproxen, salicylic acid, and valproic acid at 10 times the therapeutic maximum dose in human on trichloroacetic acid levels in urine in rat. ....	154
3.7	Impact of naproxen, salicylic acid, and valproic acid at 10 times the therapeutic maximum dose in human on trichloroacetic acid levels in lung, kidney, and liver samples. ....	155



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
0.1	Caractéristiques physico-chimiques du TCE (INRS, 2002) ..... 5
0.2	Production de TCE en tonnes ..... 6
0.3	Effets toxiques des métabolites du TCE..... 18
0.4	Voies métaboliques et enzymes impliqués dans le métabolisme des médicaments sélectionnés..... 48
1.1	Maximum drug concentrations in human blood during exposure to therapeutic dosage and drug concentrations used in the screening part of this study with rat hepatocytes. .... 75
1.2	Interaction groups of selected drugs and their effect on TCE metabolism ... 80
2.1	Maximum drug concentrations in human blood and drug concentrations used in the screening part of this study using human hepatocytes. .... 111
2.2	Interaction groups of selected drugs and their effect on TCE metabolism 117

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AAS	Acide acétylsalicylique
APAP	Acétaminophène
B <sub>max</sub>	Valeur maximale de liaison non-spécifique
C <sub>libre</sub>	Concentration de la substance libre
C <sub>liée</sub>	Concentration de la substance liée aux protéines plasmatiques
CH	Hydrate de chloral
CBZ	Carbamazépine
C <sub>max</sub>	Concentration maximale sanguine
COV	Composés organiques volatiles
COX	Cyclo-oxygénase
CYP 450	Cytochromes P-450
DCA	Acide dichloroacétique
DCVC	(Dichlorovinyl) L-cystéine
DCVCG	S-(1, 2-dichlorovinyl)-L-cystéinyglycine
DCVG	S-(1, 2-dichlorovinyl) glutathion
DL50	Dose létale 50
ES	Complexe enzyme-substrat
ESI	Complexe comprenant l'enzyme, le substrat et l'inhibiteur
f <sub>i</sub>	Fraction libre
GABA	Acide g-aminobutyrique
GGT	γ-glutamyltransférase
GST	GSH S-transférase

GSH	Voie de conjugaison avec le glutathion
GSMS	Chromatographie à phase gazeuse "headspace" couplée à un spectre de masse
I	Concentration de l'inhibiteur
$K_d$	Constante de dissociation
$K_i$	Constante d'inhibition
$K_m$	Constante d'affinité de l'enzyme pour le substrat
MCA	Acide monochloroacétique
Min	Minute
NADCVC	Acide mercapturique
NAPQI	N-acétyl- <i>p</i> -benzoquinone imine
NAP	Naproxène
OEL	Limite d'exposition professionnelle
PBPK	Modèle toxicocinétique à base physiologique
PGHS	Prostaglandine H2 synthase
S	Concentration du substrat
SNC	Système nerveux central
SAPG	Glucuronide phénolique de l'acide salicylique
SAAG	Acide salicylique acylglucuronide
TCE	Trichloréthylène
TCOH	Trichloroéthanol
$TCOH_{libre}$	Trichloroéthanol libre
$TCOH_{total}$	Trichloroéthanol total
TCOG	Glucuronide du trichloroéthanol
TCA	Acide trichloroacétique
$T_{max}$	Temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale sanguine
TLV	Valeur limite d'exposition
UDPGA	Uridine diphosphate acide glucuronique
V	Vitesse enzymatique

$V_{\max}$	Vitesse enzymatique maximale
VPA	Acide valproïque

## RÉSUMÉ

Le trichloréthylène (TCE) est un solvant volatil dont l'utilisation est très répandue. Il est métabolisé principalement dans le foie. L'oxydation est la voie principale de cette biotransformation et la conjugaison en est la secondaire. La toxicité du trichloréthylène a été étudiée dans plusieurs travaux de recherche, mais les connaissances entourant les interactions toxicologiques entre ce polluant et certains médicaments, dont certains sont couramment prescrits et/ou consommés, sont encore limitées. Ces interactions peuvent avoir un effet modulateur sur le métabolisme du trichloréthylène (TCE) et par conséquent sur sa toxicité.

L'objectif de cette étude est d'explorer les interactions toxicologiques entre le trichloréthylène et certains médicaments dont la consommation est courante. Quatorze médicaments ont été sélectionnés afin de représenter un large spectre de familles thérapeutiques. Il s'agit de l'acétaminophène, l'ibuprofène, l'acide acétylsalicylique, l'acide méfénamique, le naproxène, le diclofénac, la sulfasalazine, la cimetidine, la ranitidine, l'acide valproïque, la carbamazépine, l'amoxicilline, l'érythromycine et le glyclazide. Cette étude est réalisée dans une optique d'évaluation du risque pour la santé humaine, occasionné par l'exposition au TCE dans un contexte de consommation de l'un des médicaments considérés.

L'approche adoptée consiste, dans une première étape, en une étude *in vitro* utilisant des hépatocytes humains et de rat pour l'identification des interactions toxicologiques. Les plus prononcées sont validées et caractérisées en utilisant des microsomes humains et de rat. Pour cette étude *in vitro*, l'analyse des concentrations du trichloréthylène et de ses métabolites est réalisée par chromatographie à phase gazeuse "headspace" couplée à un spectre de masse (GC-MS). Trois médicaments ont été sélectionnés suite à cette étude *in vitro* pour la seconde étape, qui consiste en une étude *in vivo* chez le rat pour confirmer les interactions identifiées et collecter les données nécessaires pour l'extrapolation à l'humain des résultats de cette étude. Pour cette seconde étape, l'analyse des concentrations du TCE et ses métabolites dans les prélèvements (sang, urine, foie, poumons et reins) est réalisée par chromatographie à phase gazeuse "headspace" couplée à un détecteur à absorption électronique (ECD).

Les résultats de l'étude *in vitro*, aussi bien chez l'humain que le rat, montrent que la biotransformation du TCE est affectée par certains médicaments. Quatre groupes ont été identifiés. Groupe 1 englobe les médicaments qui n'occasionnent aucune modulation. Ceux des groupes 2 et 3 affectent, respectivement à la hausse et à la baisse, les deux métabolites du TCE (acide trichloroacétique (TCA) et trichloroéthanol (TCOH)). Finalement, les médicaments du groupe 4 n'occasionnent qu'un effet touchant un seul des deux métabolites, soit à la hausse ou la baisse. Les effets engendrés par certains médicaments sont similaires chez l'humain et le rat, pour d'autres les résultats sont différents. Ceux qui ont occasionné les interactions les plus prononcées ont été sélectionnés pour validation et caractérisation. L'acide salicylique, le naproxène, l'acétaminophène et l'acide valproïque sont communs aux deux espèces. Cette liste est complétée par la carbamazépine chez l'humain et le gliclazide chez le rat.

Malgré qu'une interaction a été observée avec les hépatocytes, aucune n'a pu être décelée avec le système microsomial humain et murin pour l'acide salicylique ainsi que l'acétaminophène. La modulation occasionnée par l'acide valproïque qui touche la formation du TCA et du TCOH chez le rat a été validée et caractérisée, révélant une inhibition partielle non compétitive ( $K_i=1215,8 \mu\text{M}$  et  $K_i=932,8 \mu\text{M}$ , respectivement). Chez l'humain la validation de l'effet affectant la formation du TCOH par l'acide valproïque a été négative. Le gliclazide et la carbamazépine ont montré le plus de divergences entre le rat et l'humain. Le premier reste sans effet chez l'humain, mais agit par inhibition non compétitive partielle sur la formation du TCOH chez le rat ( $K_i=58 \mu\text{M}$ ). Quant au deuxième médicament, son action a été validée et son inhibition de la formation du TCOH a été caractérisée non compétitive partielle chez l'humain ( $K_i=70 \mu\text{M}$ ), alors qu'il reste sans effet chez le rat. Pour le naproxène, ses interactions ont été positivement validées puis caractérisées. L'exploration révèle une inhibition compétitive de la voie de glucuronidation chez l'humain ( $K_i=2328,6 \mu\text{M}$ ) et compétitive partielle chez le rat ( $K_i=211,6 \mu\text{M}$ ). Néanmoins, la valeur de la constante d'inhibition  $K_i$  est du même ordre de grandeur que la concentration maximale sanguine ( $C_{\text{max}}$ ) chez le rat et de  $10XC_{\text{max}}$  chez l'humain.

Suite à l'étude *in vitro*, trois médicaments ont été sélectionnés pour l'étape *in vivo* chez le rat, pour l'intensité et la similarité de leurs réponses entre l'humain et le rat. Il s'agit de l'acide salicylique, de l'acide valproïque et du naproxène.

Pour l'acide salicylique, une augmentation du trichloroéthanol total (TCOH<sub>total</sub>) à 30, 60 et 90 min dans le sang après la fin de l'exposition, ainsi que dans l'urine ont été rapportés. Une augmentation du trichloroéthanol libre (TCOH<sub>libre</sub>) dans le sang à

90 min a aussi été mesurée. Quant à l'acide valproïque, les résultats montrent une augmentation du TCE sanguin à 30 et 120 min, ainsi que du TCA à 1080 min, dans le sang. Une augmentation du  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  dans l'urine a aussi été observée. L'inhibition non compétitive qui touche la formation du TCOH et du TCA chez le rat et l'effet observé affectant la formation du TCOH chez l'humain, qui ont été révélés *in vitro*, seraient à l'origine des modulations rapportées. Le naproxène est le médicament qui a occasionné le plus d'interactions : une augmentation du  $\text{TCOH}_{\text{libre}}$  à 30, 60 et 90 min et du  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  en tout temps dans le sang, ainsi qu'une diminution du TCA dans l'urine et une augmentation dans le foie et dans le sang à 90 min. L'inhibition compétitive chez l'humain et compétitive partielle chez le rat de la voie de glucuronidation, élucidées *in vitro*, seraient responsables de l'augmentation du  $\text{TCOH}_{\text{libre}}$  et du  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  dans le sang et qui se répercute aussi en une augmentation du TCA dans le foie.

Cette étude a confirmé que la biotransformation du TCE est affectée par certains médicaments. Il existe une similitude globale dans les réponses observées avec les hépatocytes chez l'humain et le rat et dans les mécanismes d'action, mais aussi des différences. Ce travail de recherche apporte des éléments de réponse concernant le risque occasionné par l'exposition simultanée au TCE et aux médicaments analysés. Néanmoins, pour être exploitable pour l'humain, les résultats doivent être extrapolés en mettant en place un nouveau modèle toxicocinétique à base physiologique (PBPK) qui tient compte de ces interactions révélées. Il est recommandé d'inclure dans celui-ci l'effet des liaisons protéiques et d'envisager le cas d'une exposition chronique, pour une meilleure évaluation du risque pour la santé humaine.

## PROBLÉMATIQUE

La pollution de l'environnement peut provenir de sources naturelles ou être générée par l'activité humaine. Elle affecte l'air, l'eau et le sol et constitue un enjeu environnemental et de santé publique majeur. Les polluants présents dans l'environnement contiennent une multitude de substances chimiques actives qui peuvent être toxiques pour la santé humaine : métaux, hydrocarbures aromatiques polycycliques, ozone, composés organiques volatils, microbes, allergènes, etc. Plusieurs voies d'absorption (cutanée, orale et inhalation) peuvent être empruntées par ces produits chimiques pour se retrouver à l'intérieur du corps humain. Ils peuvent non seulement affecter l'organe de la voie d'entrée, mais aussi causer des dommages à d'autres, en s'y rendant par la circulation sanguine. La pollution de l'environnement peut avoir des effets à court et/ou à long terme et la proportion de la population touchée peut être importante.

Le bagage génétique, l'hypersusceptibilité, l'âge et le sexe sont parmi les facteurs qui peuvent modifier la toxicité d'un produit chimique. D'autre part, plusieurs interactions toxiques peuvent avoir lieu simultanément, résultant de l'exposition à plus d'un produit à la fois (Calabrese, 1991; Ford *et al.*, 1995). Il peut s'agir non seulement d'interactions toxicologiques résultant de l'exposition simultanée à plusieurs polluants, mais aussi occasionnées par un ou plusieurs polluants dans un contexte de consommation médicamenteuse. L'étude de la toxicocinétique des polluants dans un contexte de consommation concomitante de médicaments présente



un intérêt important pour plusieurs secteurs : santé publique, environnement, santé et sécurité au travail, etc.

Parmi les contaminants organiques présents dans l'environnement, figure le trichloréthylène. C'est un solvant organique volatil dont l'utilisation est très répandue. Plusieurs études ont démontré la toxicité du trichloréthylène pour la santé humaine et ont conclu que les effets les plus néfastes sont engendrés par le mélange complexe de métabolites qui sont le résultat de sa biotransformation. La modulation du métabolisme du trichloréthylène, par des interactions toxicologiques qui ont lieu simultanément, peut théoriquement affecter de manière importante la toxicité de ce produit. Récemment, certaines études ont mis en évidence l'existence d'interactions toxicologiques entre le trichloréthylène et certains médicaments dont la consommation est courante. Il s'agit, entre autres, de l'aspirine et de l'acétaminophène (Plewka *et al.*, 2000; Zielińska-Psuja *et al.*, 2001; Zielińska-Psuja *et al.*, 1999). Bien qu'il s'agisse de médicaments dont la consommation est très répandue, les connaissances reliées aux mécanismes d'interactions toxicologiques entre ces produits et le trichloréthylène sont encore limitées. En théorie, ces interactions peuvent avoir lieu au niveau du foie, l'organe principal du métabolisme de la plupart des produits. Elles peuvent se traduire par une supra-additivité (synergie ou potentialisation), c'est-à-dire que la toxicité observée est supérieure à la somme des effets de chacun des constituants (Haghdoost *et al.*, 1997), ou une infra-additivité (antagonisme) lorsqu'elle en est inférieure (Calabrese, 1991; Krishnan et Brodeur, 1991, 1994).

L'objectif de cette étude est de caractériser les interactions toxicocinétiques entre le trichloréthylène et certains médicaments à usage courant. Les médicaments envisagés appartiennent à différentes familles : les anti-inflammatoires, les antihistaminiques, les anticonvulsivants, les antibiotiques et les antidiabétiques. Ces médicaments sont

l'acétaminophène, l'ibuprofène, l'acide acétylsalicylique, l'acide méfénamique, le naproxène, le diclofénac, la sulfasalazine, la cimétidine, la ranitidine, l'acide valproïque, la carbamazépine, l'amoxicilline, l'érythromycine et le gliclazide.

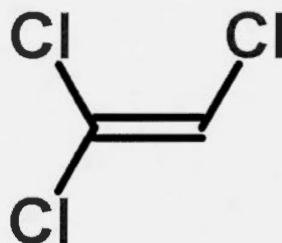
## INTRODUCTION

### 0.1 Le trichloréthylène

#### 0.1.1 Caractéristiques du trichloréthylène

Le trichloréthylène (ou trichloroéthylène) (TCE) est un composé organique, aliphatique, chloré, non saturé et de faible masse moléculaire. C'est un liquide volatil dont la formule chimique est  $C_2HCl_3$  (Figure 0.1). Il est incolore, odoriférant, de faible polarité (non chargé) et pratiquement insoluble dans l'eau, mais miscible avec la plupart des solvants organiques, tels que l'acétone, l'éthanol, l'éther diéthylique, le chloroforme ou le sulfure de carbone (INRS, 2002). Dans les conditions normales d'utilisation, le trichloréthylène est considéré comme ininflammable et modérément stable. Toutefois, des stabilisants (jusqu'à 2 % V/V) sont souvent ajoutés au TCE de qualité commerciale (McNeill, 1979; Schaumburg, 1990). Ces additifs sont nécessaires bien que le TCE soit considéré stable dans les conditions normales d'utilisation. En effet, le trichloréthylène non stabilisé se décompose lentement lorsqu'il est exposé à l'air, la lumière ou la chaleur. Cette décomposition donne naissance à des produits acides et corrosifs, tel que l'acide chlorhydrique (INRS, 2002). Le tableau 0.1 donne les caractéristiques physico-chimiques du TCE.

Selon les données de 1982, la production annuelle mondiale de TCE est d'environ



**Figure 0.1** Structure chimique du trichloréthylène  
(<http://www.chemspider.com>).

**Tableau 0.1** Caractéristiques physico-chimiques du TCE (INRS, 2002)

Paramètres	Unités	Valeurs
Masse molaire	g/mole	131,4
Température de fusion	°C	-87 à -84,7
Température d'ébullition à pression atmosphérique	°C	87
Densité	g/l	1,46
Densité de vapeur (air=1)		4,5
Tension de vapeur à 20 °C	kPa	8,6
Tension de vapeur à 70 °C		59
Température d'auto-inflammation	°C	410
Limite inférieure d'explosivité	% volumique dans l'air	8
Limite supérieure d'explosivité	% volumique dans l'air à 25 °C	90

**Tableau 0.2** Production de TCE en tonnes

Pays	1985	1987	1990	1998
États-Unis	86 000	127 000	107 000	109 000
Japon	73 000	71 000	57 000	ND
Europe de l'ouest	205 000	180 000	ND	ND

ND : Données non disponible

600 000 tonnes (Schwarzenbach *et al.*, 1983). Parmi les principaux pays producteurs de TCE figurent l'Allemagne, les États-Unis, la France, l'Italie, le Royaume-Uni et le Japon. Chacun de ces pays a produit environ 100 000 tonnes par année depuis 1978. Les chiffres les plus récents montrent une tendance à la baisse, telle qu'illustrée par le Tableau 0.2 qui donne l'évolution de la production de TCE dans certains pays de 1985 à 1998.

### 0.1.2 Applications du trichloréthylène

L'utilisation du TCE couvre une large gamme d'applications. Historiquement, il a été utilisé comme solvant pour extraire la caféine des grains de café, ainsi que les oléorésines des épices et comme produit anesthésique à usage médicale et dentaire. Il a aussi été employé comme agent de transfert dans la production de polychlorure de vinyle (Cooper et Hickman, 1982; McNeill, 1979), ainsi que dans la fabrication des produits retardateurs de flammes et les insecticides (Mannsville, 1992). Son utilisation a été interdite ou restreinte dans plusieurs de ces secteurs, mais aussi dans d'autres, tels que les aliments, les médicaments et les cosmétiques. Malgré ces restrictions, le TCE est encore largement utilisé dans les industries d'automobiles et des métaux pour le dégraissage à la vapeur et le nettoyage à froid des pièces métalliques (CMR, 1983). L'industrie du textile l'utilise également comme détachant

pour les vêtements (IARC, 1979; Kuney, 1986; Verschueren, 1983). La synthèse des hydrofluorocarbures (tel que le réfrigérant HFC 134a) n'est qu'un autre exemple de la longue liste des applications qui font appel au trichloréthylène (Cooper et Hickman, 1982; IARC, 1979; McNeill, 1979). De plus, cette molécule est souvent employée comme solvant dans plusieurs produits, tels que la peinture, les vernis et certaines colles, les encres d'imprimerie et les teintures. D'après le NIOSH ("National Institute of Occupational Safety and Health"), environ 3,5 millions de travailleurs sont exposés annuellement au TCE aux États-Unis d'Amérique.

La présence du trichloréthylène dans l'environnement est uniquement d'origine anthropique. La pollution engendrée par le TCE représente un grand risque pour l'environnement. En effet, le recyclage et la disposition du trichloréthylène est encore problématique. Environ 60 % de la production annuelle mondiale se retrouve dans l'environnement; principalement l'atmosphère et les océans (US Environmental Protection Agency (EPA), 1997).

### 0.1.3 Toxicité du trichloréthylène

L'exposition de courte durée au trichloréthylène peut causer une irritation de la peau (érythème, sensation de brûlure) et des yeux (douleur vive, larmoiement, dommages réversibles aux paupières, à la conjonctive et à la cornée). Elle peut être aussi à l'origine d'une irritation du nez et de la gorge et d'une dépression du système nerveux central (SNC). Plusieurs symptômes reliés à cette dépression peuvent se manifester, tels que des endormissements, des étourdissements, une sensation d'ébriété, des vertiges, des maux de tête et une perte de coordination (Barton et Clewell, 2000; Barton et Das, 1996).

À des concentrations élevées, l'exposition de courte durée au trichloréthylène peut entraîner des engourdissements et des douleurs au visage, des pertes de conscience et de l'arythmie cardiaque. Plusieurs organes et systèmes biologiques sont susceptibles d'être affectés par une exposition prolongée (par ingestion ou inhalation) à de fortes doses de TCE. Aussi bien chez l'humain que chez l'animal, ce genre d'exposition provoque de l'hépatotoxicité (augmentation des acides biliaires plasmatiques, accumulation de glycogène hépatique), de la néphrotoxicité (dommage au tubule proximal, lésions précancéreuses), de la neurotoxicité (changement dans la fonction du nerf trijumeau et dans le rythme cardiaque, incoordination motrice et susceptibilité à la maladie de Parkinson) et de l'immunotoxicité (sensibilité dermique et exacerbation du développement de maladies auto-immunes, telles que la sclérodermie) (Keil *et al.*, 2009; NCI, 1976; NTP, 1988). Selon l'US Environmental Protection Agency (EPA) (2001), l'incidence des cancers du rein, du foie, du système lymphatique, du cerveau et de la prostate augmente avec l'exposition au TCE.

L'exposition chronique à ce polluant peut, quant à elle, induire des tumeurs menant ultimement au décès (Barton et Clewell, 2000; Barton et Das, 1996; Bull, 2000). D'autre part, certaines études indiquent que le trichloréthylène a des effets nocifs sur l'appareil génital mâle, surtout après une longue période d'exposition (Forkert *et al.*, 2002). Ces effets peuvent avoir comme conséquences une diminution de la fécondité.

Des travaux de recherche montrent que les effets toxiques du trichloréthylène (sub-chroniques et chroniques) sont causés par ses métabolites; principalement l'acide trichloroacétique (TCA), l'acide dichloroacétique (DCA) (Bull *et al.*, 1990; Daniel *et al.*, 1992; DeAngelo *et al.*, 1996; Pereira, 1996) et le (dichlorovinyl) L-cystéine (DCVC) (Dekant *et al.*, 1989; Lock et Berndt, 1988). Ces métabolites peuvent agir seuls ou en combinaison avec des produits répandus, tel que l'éthanol, ou avec



d'autres qui le sont moins, comme les hydrocarbures benzéniques. Suite à une étude sur les effets toxiques du trichloréthylène, le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a conclu qu'il est cancérigène et l'a classé dans le groupe 2A (ATSDR, 1997; Bogen et Gold, 1997; Viau et Tardif, 2003). Le TCE et ses métabolites peuvent en effet induire le cancer du foie (hépatocarcinomes), des poumons (adénocarcinomes) et des lymphomes chez la souris (Henschler *et al.*, 1980; Maltoni *et al.*, 1986; NCI, 1976). Il a aussi été prouvé que le TCE et ses métabolites peuvent induire chez le rat des cancers au niveau du rein (adénocarcinomes), des testicules (cellules de Leydig) et possiblement la leucémie (Maltoni *et al.*, 1986; NCI, 1976; NTP, 1988; Santé Canada, 2005).

#### 0.1.4 Cinétique du trichloréthylène

Les rejets du trichloréthylène dans l'environnement contaminent l'eau, le sol et l'air. Les sources d'exposition sont donc multiples, entre autres, par la consommation d'eau potable provenant de sources contaminées et par l'inhalation d'air pollué en milieu de travail ou près de certains sites d'enfouissement (Ford *et al.*, 1995; James, 1963; Kleinfeld et Tabershaw, 1954; McCarthy et Jones, 1983; Smith, 1966). L'absorption du trichloréthylène peut se faire par voie cutanée, orale et surtout par inhalation. Une fois parvenue à l'organe cible, une fraction du trichloréthylène est métabolisée avant d'être éliminée. Les métabolites sont excrétés principalement par l'urine ou la bile. La partie non métabolisée est exhalée par les poumons (Andersen, 1981).



#### 0.1.4.1 Absorption du trichloréthylène

L'absorption par ingestion est pratiquement complète à de faibles doses (Health Canada, 2005). Le TCE est rapidement absorbé au niveau gastro-intestinal et peut atteindre 90 % de la dose, comme par exemple lors de la consommation d'eau contaminée. Mais l'absorption peut être influencée par la nourriture et le véhicule qui le transporte.

L'absorption du TCE par inhalation est rapide et atteint son maximum après deux heures d'exposition. La dose absorbée varie de 30 % à 80 %, dépendamment de la concentration et la durée d'exposition. Plusieurs études indiquent que 37 % à 64 % du trichloréthylène inhalé est absorbé par les poumons (Astrand et Ovrum, 1976; Bartonicek, 1962; Monster *et al.*, 1976). Chez les animaux, le TCE est rapidement absorbé par les poumons avec un taux d'environ 70 % de la dose inhalée (Dallas *et al.*, 1991).

L'absorption du TCE à travers la peau se fait rapidement et atteint son maximum après 5 min, aussi bien chez l'humain que chez l'animal (Sato et Nakajima, 1978). Toutefois, la mesure de l'absorption est difficile. En effet, le TCE est un solvant lipophile qui dégraisse la peau et augmente ainsi sa propre absorption (INRS, 2002).

#### 0.1.4.2 Distribution du trichloréthylène

Les données disponibles dans la littérature sur la distribution du trichloréthylène chez l'humain ou les animaux sont assez limitées. Certaines études montrent que, quelle que soit la voie d'absorption et l'organe d'entrée, le trichloréthylène se retrouve

rapidement dans la circulation sanguine. Il est alors largement distribué jusqu'aux organes cibles, tels que le foie, les reins, le système nerveux, les tissus adipeux et les muscles. Des concentrations plus importantes ont été mesurées dans les tissus adipeux (demi-vie d'environ 3,5 h à 5 h), ainsi que dans les poumons, le foie, les reins et le système nerveux (demi-vie de 2 min à 4 min) (Lash *et al.*, 2000a).

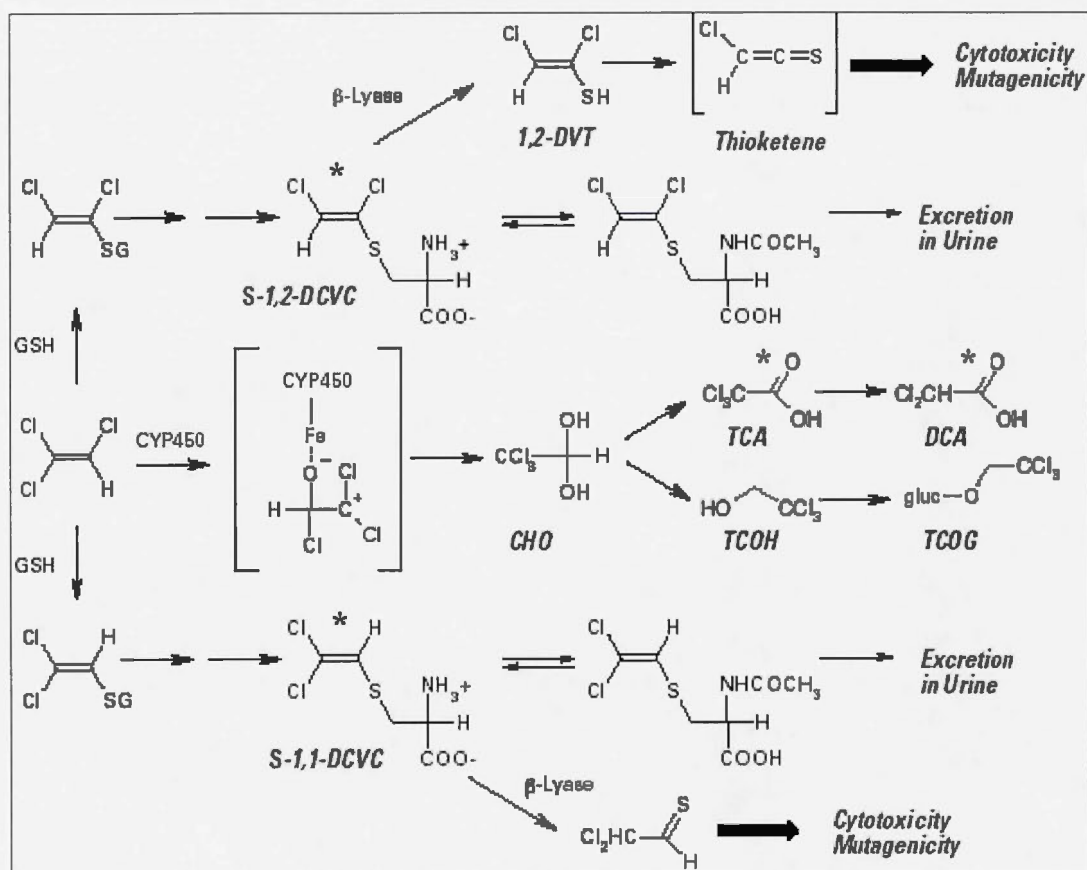
#### 0.1.4.3 Métabolisme du trichloréthylène

Le foie est l'organe principal dans lequel se déroule le métabolisme du trichloréthylène. L'oxydation est la voie principale de cette biotransformation et la conjugaison en est la secondaire (Lash *et al.*, 2000a). Le pourcentage du trichloréthylène métabolisé varie entre 40 % et 75 % de la dose absorbée (Bartonicek, 1962; Ertle *et al.*, 1972; Fernández *et al.*, 1977).

La voie métabolique principale, chez toutes les espèces étudiées, est l'oxydation (voir Figure 0.2). Dans cette voie, le trichloréthylène est d'abord converti par le cytochrome P450 (spécifiquement CYP2E1) en un époxyde intermédiaire (Byington et Leibman, 1965; Dekant *et al.*, 1990; Guengerich *et al.*, 1991; Nakajima *et al.*, 1988; Rauncy *et al.*, 1993). Celui-ci se réarrange par la suite de manière spontanée en chloral, avant de subir une hydratation pour former l'hydrate de chloral (CHO). Ce dernier est rapidement métabolisé par le CYP2E1 pour former principalement le trichloroéthanol (TCOH) et l'acide trichloroacétique (TCA) (Bonse *et al.*, 1975; Daniel, 1963; Ikeda *et al.*, 1980; Miller et Guengerich, 1983). D'autres métabolites mineurs ont été identifiés dans l'air exhalé et l'urine, notamment les monoxyde et dioxyde de carbone, l'acide oxalique, des conjugués de l'acide trichloroacétique, l'aminoéthanol-N-hydroxyacétyl et les acides mono et dichloroacétique (MCA et DCA) (Birner *et al.*, 1993; Dekant, 1984; Dekant *et al.*, 1990; Dekant *et al.*, 1986;

Hathaway, 1980; Nakajima *et al.*, 1992a; Ogata et Saeki, 1974; Traylor *et al.*, 1977). Nakajima *et al.* (1992a) ont montré que l'isoenzyme le plus important, impliqué dans la biotransformation du trichloréthylène en hydrate de chloral, est le CYP2E1. Les résultats d'autres travaux de recherche publiés par ces mêmes auteurs concluent que l'induction de cette enzyme augmente les métabolites générés par cette voie (Nakajima *et al.*, 1992b). Les travaux de Lash *et al.* (2000a) supportent que la biotransformation du TCE est catalysée chez l'homme par l'isoforme CYP2E1 à faible et à moyenne concentrations, avec des  $K_m$  correspondants de 520  $\mu\text{M}$  et 820  $\mu\text{M}$  respectivement. Ces mêmes auteurs supportent, qu'à fortes concentrations, le TCE est biotransformé secondairement par les isoformes CYP1A1/2, CYP2B1/2 et CYP2C11/6 (Lash *et al.*, 2000a).

Lors d'expositions à de fortes concentrations de trichloréthylène, la voie d'oxydation P450 devient saturée et à celle-ci vient s'ajouter la voie de conjugaison (Dekant *et al.*, 1987). Bien que cette voie soit décrite comme une voie de détoxification des métabolites générés par la voie d'oxydation, il a été démontré qu'elle est aussi impliquée dans plusieurs réactions de toxicité (Anders *et al.*, 1988; ICIS, 2000). La voie de conjugaison ou GSH se produit, elle aussi, principalement dans le foie. La première étape dans cette voie est la formation du conjugué de glutathion qui est le S-(1, 2-dichlorovinyl) glutathion (DCVG), catalysé par le GSH S-transférase (GST) (voir Figure 0.2) (Dekant *et al.*, 1990). Par la suite, le DCVG est biotransformé par la  $\gamma$ -glutamyltransférase (GGT) pour libérer l'acide glutamique et former le conjugué cystéine : S-(1, 2-dichlorovinyl)-L-cystéineglycine (DCVCG). Ce dernier est dégradé par la cystéineglycine dipeptidase afin de libérer la glycine et former un mélange d'isomères. Celui-ci contient le S-(1, 1-dichlorovinyl) L-cystéine (1, 1-DCVC) et le S-(1, 2-dichlorovinyl) L-cystéine (1, 2-DCVC) (Hughey *et al.*, 1978; Lash *et al.*, 2000b). Ces deux isomères subissent des réactions différentes avant d'être excrétés. Généralement, le 1, 1-DCVC subit une acétylation pour donner un



**Figure 0.2** Les voies de biotransformation du trichloréthylène (Dobrev *et al.*, 2002). (\*: représente les métabolites toxiques).

métabolite non toxique : l'acide mercapturique (NADCVC) qui sera excrété par la suite dans l'urine (Derra et Schultze, 1963). Alors que le 1, 2-DCVC est dirigé vers le rein, où il sera biotransformé par la  $\beta$ -lyase en métabolites réactifs, tels que le S-(1, 2-dichlorovinyl) thiol (thiol instable), l'acide pyruvique et l'ammoniaque (Anders et Dekant, 1998; Bruening et Bolt, 2000; Stijntes *et al.*, 1992; Yamauchi *et al.*, 1993). Plusieurs études suggèrent que la bioactivation de la  $\beta$ -lyase est l'étape clé de la néphrotoxicité du DCVC (Dekant *et al.*, 1989; Lock et Berndt, 1988).

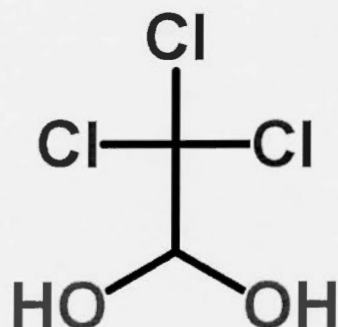


#### 0.1.4.1 L'hydrate de chloral

Le CHO, dont la structure est illustrée par la Figure 0.3, est le premier métabolite de la voie d'oxydation du trichloréthylène. Plusieurs études confirment que la toxicité du CHO affecte principalement les poumons (Collin *et al.*, 2005; Daniel *et al.*, 1992; DeAngelo *et al.*, 1989). En effet, l'accumulation de CHO dans les cellules de Clara du poumon provoque des lésions et entraîne la formation de tumeurs. Ces résultats sont soutenus par les travaux de George *et al.* (2000), qui ont montré que le CHO provoque une augmentation du nombre d'animaux ayant développé des tumeurs et une multiplication du nombre de cas de néoplasie hépatocellulaire. De plus, les travaux de Ho *et al.* (2003) ont mis en évidence les effets toxiques et les mécanismes de mort cellulaire causés par l'exposition au CHO chez le rat et les cellules de foie et des lymphocytes humains.

#### 0.1.4.3.2 Les acides trichloroacétique (TCA) et dichloroacétique(DCA)

La biotransformation du CHO génère le TCA comme l'un des principaux métabolites de la voie d'oxydation (l'autre étant le TCOH), ainsi que le DCA comme dérivé secondaire. Bien que le DCA se retrouve dans le sang à de très faibles concentrations, plusieurs études suggèrent qu'il joue un rôle important dans l'induction des tumeurs dans le foie et dans l'accumulation de glycogène hépatique (Bull, 2000). En effet, les résultats des travaux de Bull *et al.* (2004) montrent que la présence du DCA supprime le mécanisme de l'apoptose, ce qui induit la formation de tumeurs dans le foie. Quant aux résultats des travaux de Ge *et al.* (2001), ils indiquent que le TCA et le DCA sont responsables d'une hypométhylation de l'ADN et une prolifération des peroxysomes et des cellules, provoquant ainsi le cancer du foie.



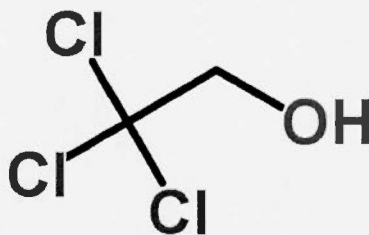
**Figure 0.3** Structure de l'hydrate de chloral (<http://www.chemspider.com>).

#### 0.1.4.3.3 Le trichloroéthanol (TCOH)

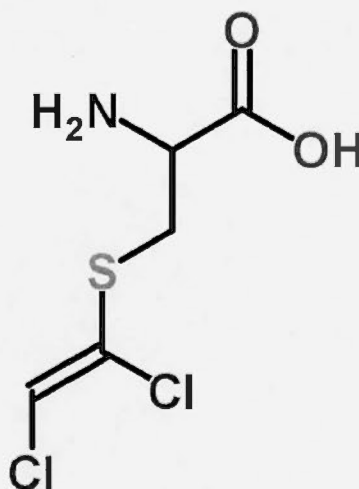
Le TCOH est l'un des principaux métabolites de la voie d'oxydation. Sa structure est illustrée par la Figure 0.4. Green *et al.* (2003) ont démontré que le TCOH provoque chez le rat une acidification de l'urine, ainsi qu'une augmentation de l'acide méthylmalonique urinaire et du N-méthyltétrahydrofolate plasmatique. Ceci indique une carence en vitamine B12 et une altération du métabolisme folique.

#### 0.1.4.3.4 Le S-(1, 2-dichlorovinyl) L-cystéine (DCVC)

Le S-(1, 2-dichlorovinyl) L-cystéine (DCVC) est un métabolite généré par la voie de conjugaison du TCE avec le glutathion (Figure 0.5). Certaines études ont rapporté que la toxicité induite par le TCE est plus faible que celle provoquée par le DCVC.



**Figure 0.4** Structure du trichloroéthanol (TCOH)  
(<http://www.chemspider.com>).



**Figure 0.5** Structure du S-(1, 2-dichlorovinyl) L-cystéine  
(<http://www.chemspider.com>).

D'autre part, les travaux de Lash *et al.* (2001) montrent que le DCVC accélère l'apoptose et provoque une nécrose des cellules du tube proximale. De plus, les résultats des travaux de ces mêmes auteurs illustrent le rôle important de ce

métabolite dans l'expression des mécanismes épigénétiques, responsables de l'apparition des tumeurs hépatiques (Lash *et al.*, 2000b). Le DCVC provoque aussi des ruptures bicaténares de l'ADN, ainsi qu'une synthèse non programmée de celui-ci dans les cellules LLC-PK (une lignée cellulaire porcine immortalisée du tube proximal) (Lash *et al.*, 2000b).

#### 0.1.4.4 Élimination du trichloréthylène

Les voies d'élimination du TCE et de ses métabolites sont similaires chez l'humain et le rat, quelle que soit la voie d'absorption. Le TCE sous forme inchangé (10 % à 28 %), ainsi que d'autres métabolites volatiles mineurs (CO, CO<sub>2</sub>, 2 % de TCOH), sont éliminés dans l'air expiré dans les 18 h qui suivent l'exposition. L'excrétion du trichloréthylène dans la bile représente une voie mineure d'élimination. Les métabolites principaux, c'est à dire le TCOH libre ou conjugué (29 % à 50 %) avec une demi-vie de 10 h à 15 h chez l'humain (Monster, 1979; Monster *et al.*, 1979; Sato *et al.*, 1977) et l'acide trichloracétique TCA (10 % à 24 %) avec une demi-vie de 52 h, ainsi que les métabolites mineurs (DCA, MCA), sont éliminés dans l'urine (Monster *et al.*, 1976; Sato *et al.*, 1977).

## 0.2 La consommation médicamenteuse

En 2010, le chiffre d'affaire du marché mondial des médicaments a été évalué à 870 milliards de dollars US, en progression de 5,8 % par rapport à 2009. En 1990, ce même chiffre d'affaire ne représentait que 200 milliards de dollars US. Il s'agit d'une croissance annuelle moyenne d'un plus que 7,6 % (Leem, 2012). D'après l'IMS Health (2008), les ventes en détail de médicaments, dans les 13 pays suivis par cette



**Tableau 0.3** Effets toxiques des métabolites du TCE

Métabolites	Effet Toxiques
Hydrate de chloral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lésions</li> <li>• Formation de tumeurs dans les cellules Clara (Collin <i>et al.</i>, 2005; Daniel <i>et al.</i>, 1992; DeAngelo <i>et al.</i>, 1989)</li> <li>• Néoplasie hépatocellulaire (Ho <i>et al.</i>, 2003)</li> </ul>
Acide dichloroacétique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induction de tumeurs dans le foie</li> <li>• Accumulation de glycogène hépatique (Bull, 2000)</li> <li>• Suppression du mécanisme de l'apoptose</li> </ul>
Acide trichloroacétique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypométhylation de l'ADN</li> <li>• Prolifération des peroxysomes</li> <li>• Cancer</li> </ul>
Trichloroéthanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acidification de l'urine</li> <li>• Augmentation de l'acide méthylmalonique urinaire</li> <li>• Carence en vitamine B12</li> <li>• Altération du métabolisme folique</li> </ul>
Le S-(1, 2-dichlorovinyl) L-cystéine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Accélération de l'apoptose</li> <li>• Nécrose des cellules du tube proximale</li> <li>• Apparition des tumeurs hépatiques</li> <li>• Ruptures bicaténares de l'ADN</li> </ul>

organisation, ont augmenté de 5 % en 2006 par rapport à 2005; passant de 370 015 millions de dollars US à 388 281 millions de dollars US. Cette croissance soutenue persiste depuis plusieurs années. En effet, la consommation mondiale de médicaments a franchi le cap de 94 milliards de dollars US en 1985, alors qu'elle ne

représentait qu'une valeur de 43 milliards de dollars US en 1976. Soit une croissance annuelle moyenne de 9,1 % environ (OMS, 1990) Les paragraphes précédents présentent des données qui ne sont pas nécessairement identiques : chiffre d'affaire mondial, ventes en détail des pharmacies dans les 13 principaux marchés du globe et valeur en dollars US de la consommation mondiale de médicaments. Toutefois, la croissance soutenue de la consommation médicamenteuse dans le monde y est clairement illustrée.

L'Amérique du Nord (États-Unis et Canada) est le plus important consommateur et représente 39 % du marché mondial, loin devant l'Europe (17,5 %), le Japon (11 %) et les pays émergents (Chine et Brésil, 6 %). (Leem, 2012). Au Canada, la consommation de médicaments brevetés a augmenté de 14,8 % en 1995 comparée à 1994. Dans la même période, le nombre d'ordonnances a augmenté de 3,7 % (Barat *et al.*, 2000). Dans l'Union européenne, environ 4 000 différentes molécules sont ou ont été utilisées en médecine humaine, tels que les analgésiques et anti-inflammatoires, les contraceptifs, les antibiotiques, les bêta-bloquants et les régulateurs de lipides. Dans plusieurs pays tels que l'Angleterre, l'Allemagne et l'Australie, les quantités des médicaments les plus fréquemment utilisés sont de l'ordre de plusieurs centaines de tonnes par année (Huschek *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2002; Khan et Ongerth, 2004). La consommation annuelle en 2001 de l'ibuprofène, de l'acétaminophène et du diclofénac en Allemagne était respectivement de 335, 622 et 86 tonnes (Huschek *et al.*, 2004). En Angleterre, la consommation annuelle de ces 3 médicaments largement utilisés était respectivement de 163, 390 et 26 tonnes en 2000 (Jones *et al.*, 2002).

De nos jours et dans plusieurs pays, un pourcentage de plus en plus important de la population a des prescriptions pour un ou plusieurs médicaments et parfois pour de longues périodes de temps. Selon Santé Québec, la proportion de personnes ayant

consommé plus qu'un médicament a plus que doublé entre 1987 et 1998; passant de 8,3 % à 17 % (Collin *et al.*, 2005; ICIS, 2000).

La croissance soutenue de la consommation médicamenteuse multiplie les possibilités d'expositions simultanées à des médicaments et à des polluants environnementaux, tel que le trichloréthylène. La co-exposition étant un facteur pouvant conduire à des interactions pharmacocinétiques et/ou pharmacodynamiques susceptibles de moduler la toxicité de ces polluants et en particulier le TCE. Il est donc important d'investiguer les effets de cette co-exposition pour une meilleure évaluation du risque pour la santé humaine.

### 0.3 Hypothèses d'interactions toxicocinétiques entre le TCE et les médicaments sélectionnés

Les médicaments qui ont été sélectionnés pour cette étude couvrent une large gamme : des anti-inflammatoires (acétaminophène, ibuprofène, acide méfénamique, naproxène, diclofénac, sulfasalazine et acide acétylsalicylique dont le nom commercial est l'aspirine), des antihistaminiques (cimétidine et ranitidine), des anticonvulsivants (acide valproïque et carbamazépine), des antibiotiques (amoxicilline et érythromycine) et un antidiabétique (gliclazide).

La plupart des médicaments de cette étude sont métabolisés et éliminés principalement dans le foie, par la voie de glucuronidation (Evans et Relling, 1999; McGurk *et al.*, 1998). Le trichloréthylène, quant à lui, est métabolisé principalement par la voie d'oxydation, suivie par une glucuronidation des métabolites générés par cette voie et secondairement par la voie de conjugaison. Donc, la présence d'un des médicaments considérés ou de ses métabolites pourrait altérer, par stimulation ou

inhibition, le fonctionnement des enzymes du CYP450 et/ou les glucuronyl-S-transférases (enzymes catalysant les réactions de glucuronidation) de manière directe ou indirecte. Ceci aurait pour effet une accentuation, ou une atténuation des doses biologiquement effectives du TCE dans les organes cibles et donc un impact potentiel sur sa toxicité. Outre l'altération des enzymes de ces deux dernières voies (oxydation et glucuronidation), les médicaments pourraient aussi inhiber la voie de conjugaison, soit par une déplétion du glutathion ou tout simplement en réduisant l'activité du glutathion S-transférase.

Quelques travaux antérieurs ont confirmé l'existence de telles interactions toxicologiques entre le trichloréthylène et certains médicaments, tels que l'acétaminophène (Plewka *et al.*, 2000) et l'acide acétylsalicylique (ASA) (Zielińska-Psujka *et al.*, 2001; Zielińska-Psujka *et al.*, 1999). D'autre part, des études récentes révèlent que certains médicaments inhibent les enzymes qui n'interviennent pas directement dans leurs voies de biotransformation. Par exemple, l'acide valproïque, bien qu'il soit transformé par la voie de glucuronidation, peut inhiber plusieurs autres UDP-glucuronosyltransférases qui ne sont pas impliqués dans sa voie de biotransformation (Ethell *et al.*, 2003; Kiang *et al.*, 2005). Ceci pourrait induire une réduction ou une inhibition incompétitive de la voie de glucuronidation du trichloréthylène et se traduirait par une accumulation des métabolites toxiques.

D'autres travaux montrent que la cimétidine peut inhiber les enzymes CYP1A2, CYP2E1 (Brogden *et al.*, 1978; Lefranc *et al.*, 2006), CYP2C6 (Szutowski *et al.*, 2002) et CYP2C11 (Kiang *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 1998); quatre isoformes impliqués dans la voie d'oxydation du TCE. Ceci se traduirait par une réduction ou même une inhibition de la voie d'oxydation du trichloréthylène, ainsi qu'une stimulation de la voie de conjugaison avec le glutathion. Une telle interaction pourrait avoir comme résultat une augmentation des ratios de métabolites générés par cette

voie et serait responsable d'une augmentation des taux d'incidence de néphrotoxicité occasionnée par le TCE.

Le diclofénac et le naproxène sont d'autres exemples de médicaments dont l'action de bloquer les enzymes qui ne participent pas dans leurs biotransformations a été confirmée. Certains travaux de recherche ont révélé que le diclofénac entraîne l'inhibition du CYP2E1, même s'il n'est pas un substrat de cet enzyme (Tassaneeyakul *et al.*, 1998). Ce médicament pourrait par conséquent induire une réduction significative, ou même l'inhibition totale de la voie d'oxydation du trichloréthylène.

Finalement, les résultats d'autres travaux de recherche rapportent que le diclofénac ainsi que la ranitidine peuvent réduire l'activité de certains UDP-glucuronosyltransférases (Itoh *et al.*, 2000; Kiang *et al.*, 2005).

Les résultats des études et des travaux de recherche antérieurs indiquent donc un potentiel élevé d'interactions toxicologiques entre le trichloréthylène et certains médicaments.

#### 0.4 Mode d'action et métabolisme des médicaments choisis

##### 0.4.1 Les anti-inflammatoires

La famille des anti-inflammatoires englobe plusieurs médicaments avec des structures chimiques variées. Ils sont couramment prescrits pour diminuer les réactions inflammatoires, ainsi que pour soulager la douleur et la fièvre. Ils sont

parfois utilisés pour des traitements à long terme, tel que dans le cas de maladies rhumatismales (Fent *et al.*, 2006). Les anti-inflammatoires agissent en inhibant, soit de manière réversible ou irréversible, l'un des deux isoformes de l'enzyme cyclo-oxygénase (COX-1 ou COX-2). Ces deux enzymes catalysent la synthèse de différentes prostaglandines, médiateurs de la réaction inflammatoire, à partir de l'acide arachidonique (Vane et Botting, 1998).

Il existe deux catégories d'anti-inflammatoires :

- Les anti-inflammatoires stéroïdiens contenant de la cortisone ou ses dérivés. Ces substances sont susceptibles d'entraîner des problèmes gastriques (ulcère, saignement, etc.).
- Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) représentent de molécules qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Les AINS peuvent présenter toutes ou seulement quelques unes de ces propriétés thérapeutiques. Pour la plupart d'entre eux, ce sont des acides organiques faibles ( $pK_a=3$  à  $5$ ), ayant des propriétés pharmacocinétiques similaires, c'est-à-dire un volume de distribution entre  $0,01$  et  $0,05$  l/kg et une clairance d'élimination rénale faible. La fraction non liée aux protéines plasmatiques joue un rôle important dans l'activité analgésique.

#### 0.4.1.1 L'acide salicylique

L'acide acétylsalicylique (AAS) est un analgésique largement prescrit. Il possède des propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires. Il est aussi utilisé dans la prévention secondaire des maladies cardio-vasculaires (Abramson et Weissmann, 1989; Insel, 1999). La Figure 0.6 montre la structure de cette molécule. Plusieurs études indiquent

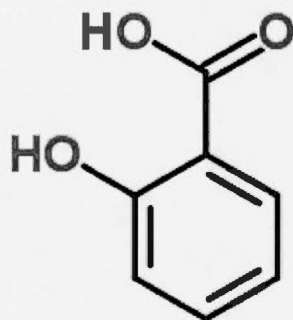


que l'aspirine (nom commercial de l'acide acétylsalicylique) peut être un agent de prévention efficace contre le cancer; notamment celui du colon rectal (Baron et Sandler, 2000). Généralement l'acide acétylsalicylique est administré par voie orale. Il est rapidement désacétylé pour former de l'acide salicylique (Hutt *et al.*, 1986) dans la paroi intestinale et dans le foie (Patel *et al.*, 1990). Environ 10 % de l'acide salicylique est éliminé sous forme inchangé dans l'urine et 80 % est métabolisé dans le foie par conjugaison avec la glycine ou l'acide glucuronique, ou par oxydation. Une grande proportion de ces salicylates (métabolites provenant de la biotransformation de l'AAS) est éliminée dans l'urine sous forme d'acide salicylurique (75 %), de glucuronide phénolique de l'acide salicylique (SAPG) (10 %), d'acide salicylique acyl glucuronide (SAAG). (5 %) et d'acide gentisique (moins de 1 %) (Caldwell *et al.*, 1980; Cummings *et al.*, 1966; Emudianughe *et al.*, 1986).

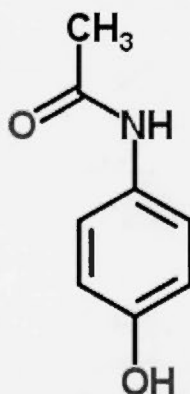
#### 0.4.1.2 L'acétaminophène

L'acétaminophène, connu aussi sous le nom de paracétamol, (N-acétyl-p-aminophénol : APAP) est un médicament très populaire ayant des propriétés antipyrétiques et analgésiques. Sa structure est illustrée par la Figure 0.7. Il est indiqué dans le traitement symptomatique de la fièvre et des douleurs d'intensité faible à modérée. Contrairement aux AINS et notamment l'aspirine, il est dépourvu de propriétés anti-inflammatoires. L'acétaminophène est un acide organique faible, liposoluble et modérément soluble dans l'eau, ayant une valeur de pKa de 9,5. Il agit en inhibant l'enzyme prostaglandine H2 synthase (PGHS) (Aronoff *et al.*, 2006) et plus spécifiquement l'isoenzyme COX-3 (Chandrasekharan *et al.*, 2002). Ces enzymes inhibent la production de prostaglandines, impliquées dans les processus de la douleur et de la fièvre. L'acétaminophène est toujours administré par voie orale.





**Figure 0.6** Structure de l'acide salicylique (<http://www.chemspider.com>).



**Figure 0.7** Structure de l'acétaminophène (<http://www.chemspider.com>).

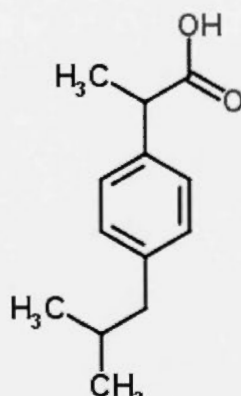
Son absorption sous forme de solution est très rapide chez les jeunes sujets sains. La concentration sanguine maximale ( $C_{\max}$ ) est atteinte environ 15 min à 30 min après ingestion. L'absorption à partir de comprimés est généralement plus lente. La  $C_{\max}$  est atteinte environ 1 h après l'administration d'une dose thérapeutique (Prescott, 1974). L'absorption de l'acétaminophène a lieu dans le tractus gastro-intestinal par diffusion passive (Bagnall *et al.*, 1979). Elle est négligeable dans l'estomac, mais très rapide dans l'intestin grêle; le taux d'absorption dépend par conséquent de la vitesse de vidange gastrique (Heading *et al.*, 1973). Après son absorption, l'acétaminophène est

rapidement distribué, de façon relativement uniforme, dans les tissus (Brodie et Axelrod, 1949). Sa liaison aux protéines plasmatiques est négligeable (Gazzard *et al.*, 1973). Le volume apparent de distribution chez l'homme est d'environ 0,91 L/kg.

L'acétaminophène est largement métabolisé et seulement 2 % à 5 % de la dose thérapeutique est excrétée sous forme inchangée dans l'urine. Bien que le métabolisme se produit principalement dans le foie, il peut y avoir une certaine biotransformation de ce médicament dans l'intestin et les reins (Josting *et al.*, 1976; Mitchell *et al.*, 1977). L'APAP est biotransformé principalement par les CYP2E1 et CYP1A2 et marginalement par le CYP3A4 en un composé électrophile toxique : N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) (Dahlin *et al.*, 1984; Nelson, 1990; Prescott, 1983; Vermeulen *et al.*, 1992). Ce dernier subit une conjugaison avec le glutathion (GSH) pour former le 3-S glutathionyl conjugué de l'APAP (APAP-GSH). Dans les cas où la glucuronidation et la sulfatation se retrouvent saturées, l'oxydation devient la voie principale de biotransformation de l'acétaminophène (Nelson, 1990; Prescott, 1983; Vermeulen *et al.*, 1992). Les métabolites conjugués et hydroxylés sont excrétés dans l'urine. À des doses thérapeutiques, la principale voie d'excrétion de l'APAP est la glucuronidation (52 % à 57 % des métabolites dans l'urine), avec une contribution secondaire de la sulfatation (30 % à 40 %) et finalement l'oxydation (5 %) (Patel *et al.*, 1992; Prescott, 1983).

#### 0.4.1.3 L'ibuprofène

Il est l'un des anti-inflammatoires les plus utilisés dans le monde. Il procure un soulagement rapide et il est doté de propriétés analgésiques et antipyrétiques (Davies et Anderson, 1997). Sa structure est illustrée par la Figure 0.8. Ce médicament



**Figure 0.8** Structure de l'ibuprofène (<http://www.chemspider.com>).

présente une pharmacocinétique linéaire aux doses thérapeutiques et ses propriétés pharmacologiques sont attribuées à la suppression de la synthèse des prostaglandines, par inhibition non sélective des cyclo-oxygénases 1 et 2. Il est commercialisé sous forme de racémate et l'action inhibitrice des cyclo-oxygénases est due à l'énantiomère S. La fixation de l'ibuprofène aux protéines plasmatiques atteint 99 % avec un faible volume de distribution. Sa demi-vie est de 2 h.

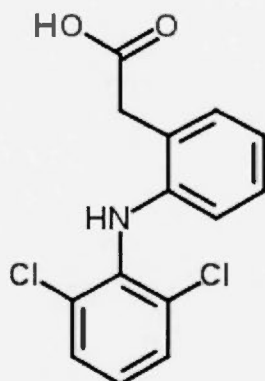
Il est, pour la grande partie, métabolisé dans le foie par voie d'oxydation ou d'hydroxylation (principalement par les CYP2C9 et CYP2C8) et par glucuronidation (Davies, 1998; Hamman et al., 1997; Leeman et al., 1993). Ce médicament est biotransformé en deux principaux métabolites : le (4-(2-hydroxy-2-méthylpropyl)phényl) acide propanoïque (2-hydroxy-ibuprofène) et le (4-(2-carboxypropyl) phényl) acide propanoïque (carboxy - ibuprofène). Ces deux métabolites sont formés à partir du 3-hydroxy-ibuprofène et du 1-hydroxy-ibuprofène (un métabolite mineur). Le produit parent ainsi que ses métabolites sont conjugués avec l'acide glucuronique (Faed, 1984; Spahn-Langguth et Benet, 1992). L'excrétion de l'ibuprofène et de ses métabolites est rapide et quasi totale en 24 h. Elle se fait principalement (plus de 90 %) par l'urine. Environ 10 % de la dose est

excrétée sous forme inchangée et 90 % sous forme de métabolites inactifs ; principalement des glucuroconjugués.

#### 0.4.1.4 Le diclofénac

Le diclofénac est un acide ayant un pKa de 4. Il est composé d'acide phénylacétique, d'un groupe amine secondaire et d'un cycle phényle contenant des atomes de chlore (Sallmann, 1986). Sa structure est illustrée par la Figure 0.9. C'est un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) de la classe des acides phénylacétiques. Les médicaments de cette classe présentent une activité anti-inflammatoire et analgésique. Le mécanisme d'action du diclofénac est similaire aux autres AINS. Il agit sur la prostaglandine synthétase, tout en inhibant les isoenzymes cyclo-oxygénase COX-1 et COX-2 de façon non spécifique, aussi bien dans le tissu affecté que dans le système nerveux (Vane et Botting, 1996; Warner *et al.*, 1999).

Il a été estimé que le diclofénac avait une biodisponibilité orale entre 54 % à 90 %, en raison du métabolisme de premier passage du médicament dans l'intestin et le foie qui élimine une partie de la substance avant son entrée dans la circulation sanguine systémique (Davies et Anderson, 1997). Il présente un faible volume de distribution (0,12 à 0,17 L/kg). Le diclofénac, comme tous les AINS, se lie fortement aux protéines plasmatiques à un taux  $\geq 99,5$  % ; en particulier l'albumine (Chamouard *et al.*, 1985; Riess *et al.*, 1978). La demi-vie du diclofénac dans le plasma varie de 1 h à 3 h (Adeyeye et Li, 1990; Degen *et al.*, 1988; Landsdorp *et al.*, 1990; Reynolds, 1993; Said et Sharaf, 1981; Willis *et al.*, 1979). Le Diclofénac est métabolisé essentiellement par hydroxylation au niveau du foie, principalement par les CYP3A4 et CYP2C9 (Small, 1989). Les métabolites du diclofénac, produits lors de la phase d'oxydation, subissent immédiatement après une glucuronidation et une sulfatation



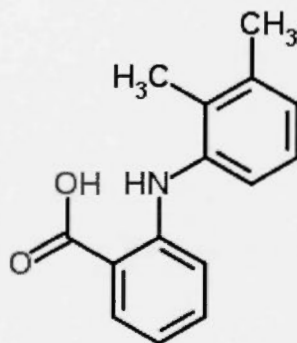
**Figure 0.9** Structure du diclofénac (<http://www.chemspider.com>).

(Kirchheiner *et al.*, 2003). Le diclofénac et ses métabolites sont excrétés dans l'urine et la bile.

#### 0.4.1.5 L'acide méfénamique

L'acide méfénamique est un dérivé de l'acide anthranilique et fait partie de la classe des fénamates. Sa structure est illustrée par la Figure 0.10. Il possède des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques marquées. L'acide méfénamique inhibe la cyclo-oxygénase et la synthèse des prostaglandines qui y est liée.

Il est rapidement absorbé après administration orale. Par voie entérale, son absorption atteint 70 %. Les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes en 2 h à 4 h et la demi-vie est approximativement de 2 h (Champion et Graham, 1978). Le volume de distribution apparent de l'acide méfénamique est de 1,06 L/kg (Tall et Mistilis, 1975). Comme tous les anti-inflammatoires non stéroïdiens, l'acide méfénamique se lie fortement aux protéines plasmatiques à un taux d'environ 99 %.



**Figure 0.10** Structure de l'acide méfénamique (<http://www.chemspider.com>).

L'acide méfénamique est métabolisé essentiellement par le CYP2C9. Cette biotransformation produit un métabolite principal : l'acide 3-hydroxy méfénamique et un secondaire : l'acide 3-carboxy méfénamique. Ces deux métabolites subissent par la suite une glucuronidation (McGurk *et al.*, 1996). Environ 50 % de la dose absorbée est excrétée sous forme de métabolites 3-hydroxyméthylés conjugués et 3-carboxylés libres ou conjugués. Une fraction minime est éliminée par voie rénale sous forme d'acide méfénamique conjugué.

#### 0.4.1.6 Le naproxène

Le naproxène est un acide faible, soluble dans les lipides et pratiquement insoluble dans l'eau à un pH faible, mais l'est facilement à un pH élevé (alcalin). Sa structure est illustrée par la Figure 0.11. Le coefficient de partage octanol : eau du naproxène à pH=7,4 est de 1,6 à 1,8 (Amaral *et al.*, 2001). Il est couramment prescrit pour le traitement de la douleur aiguë et chronique, des maladies rhumatismales et de l'arthrose. Il agit en inhibant, de façon non sélective, l'activité de la cyclo-oxygénase (COX). Il inhibe, par conséquent, la formation de médiateurs pro-inflammatoires



comme les prostaglandines (PG) et les thromboxanes (TXB) (Brogden *et al.*, 1979; Vane, 1971). Le naproxène est prescrit sous forme de l'énantiomère S, qui est pharmacologiquement plus actif que l'énantiomère R.

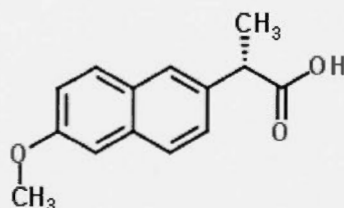
Le naproxène est rapidement et complètement absorbé par le tractus gastro-intestinal avec une biodisponibilité *in vivo* de 95 %. La demi-vie de ce médicament varie de 12 h à 17 h (Niazi *et al.*, 1996) et la concentration plasmatique maximale est atteinte 2 h à 4 h après ingestion. Le naproxène présente un volume de distribution de 0,6 L/kg.

Il est largement métabolisé dans le foie en naproxène 6-O déméthylé, principalement par les CYP1A2 et CYP2C9. Le naproxène et le naproxène 6-O déméthylé sont conjugués par l'UGT2B7 (Toothaker *et al.*, 2000). Le naproxène et ses métabolites sont excrétés principalement par voie urinaire. Environ 10 % de la dose absorbée est éliminée sous forme inchangée, 40 % en glucuronoconjugués, 5 % en désméthyl naproxène, 12 % en glucuronide de désméthyl naproxène et approximativement 30 % en conjugués inconnus du naproxène et du désméthyl naproxène (Sevelius *et al.*, 1980).

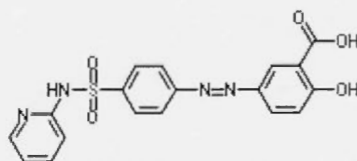
#### 0.4.1.7 La sulfasalazine

La sulphasalazine est utilisée pour traiter des affections intestinales inflammatoires, tels que la colite ulcéreuse, la rectite ulcéro-hémorragique distale (Dissanayake et Truelove, 1973; Khan *et al.*, 1980) et la maladie de Crohn (Summers *et al.*, 1979). Sa structure est illustrée par la Figure 0.12. Ce médicament agit en atténuant les symptômes de l'inflammation chronique de l'intestin.





**Figure 0.11** Structure du naproxène (<http://www.chemspider.com>).



**Figure 0.12** Structure de la sulfasalazine (<http://www.chemspider.com>).

La sulfasalazine s'avère être un inhibiteur relativement faible de la cyclo-oxygénase, mais possède une action puissante sur la 15-prostaglandine déshydrogénase (PGDH) ; principale enzyme du métabolisme des prostaglandines. La sulfasalazine est mal absorbée et sa demi-vie est d'environ 5 h à 10 h. Elle est probablement affectée par le processus d'absorption. En effet, seule une petite fraction de la sulfasalazine administrée par voie orale est absorbée (3 % à 12 %) (Schroder et Campbell, 1972). L'essentiel de la dose ingérée se déplace de l'intestin grêle vers le côlon, où elle subit une réduction de la liaison azoïque par les bactéries intestinales,

formant ainsi deux métabolites qui sont la sulfapyridine et l'acide 5-aminosalicylique (Peppercorn et Goldman, 1972; Schroder et Campbell, 1972). Une grande partie de la sulfapyridine formée est presque complètement absorbée et éliminée par hydroxylation, glucuronidation et acétylation. Le N-acétyl sulfapyridine est le principal produit formé à partir de l'acétylation de la sulfapyridine (Das et Dubin, 1976). En ce qui concerne l'autre métabolite, un faible pourcentage de l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA, 20 % à 30 %) est absorbé et excrété dans l'urine, principalement sous forme acétylée, alors que la plus grande partie du 5-ASA est excrétée dans les fèces (Das et Dubin, 1976).

#### 0.4.2 Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des médicaments ayant la capacité, à faibles doses, de détruire les micro-organismes tout en étant inoffensifs pour les cellules de l'organisme hôte. Le terme antibiotique est réservé aux médicaments ciblant les bactéries. Le mécanisme d'action des antibiotiques n'est pas toujours parfaitement élucidé. Ces médicaments peuvent être répartis en cinq classes selon leur mode d'action :

- Les antibiotiques qui ont une action sur la synthèse du peptidoglycane. Ils agissent en interférant à l'une des cinq étapes de la biosynthèse du peptidoglycane. Ils n'ont aucun effet sur les bactéries dépourvues de paroi. On retrouve dans cette classe les fosfomycines, les cyclosérines, les bacitracines, les bêta-lactames, etc.
- Les antibiotiques qui bloquent la synthèse de la membrane bactérienne. Cette classe regroupe les médicaments possédant un polypeptide cyclique et un acide gras. Leurs propriétés hydrophobes leur confèrent la capacité de pénétrer à

l'intérieur de la membrane cellulaire et de s'incorporer à la couche lipidique. Ceci entraîne une désorganisation de la structure membranaire et provoque, ainsi, la mort cellulaire. Les polymyxines B et E sont des exemples de médicaments appartenant à cette classe.

- Les antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines. Ils agissent au niveau des ribosomes de manière à inhiber la synthèse des protéines. Dans cette classe on retrouve, entre autres, les aminosides, les tétracyclines, les macrolides et les lincosamides.
- Les antibiotiques qui agissent par inhibition compétitive. Les médicaments de cette classe interfèrent dans la synthèse de l'acide tétrahydrofolique. Celui-ci intervient dans de nombreuses voies métaboliques, notamment la synthèse des purines et des pyrimidines. Parmi les antibiotiques de cette classe figurent les sulfamidés.
- Les antibiotiques qui ont une action sur l'ADN. Ils agissent en inhibant la réplication ou la transcription de l'ADN. Le novobiocine, les imidazolés, les nitrofuranes, les rifamycines et les quinolones sont des exemples de médicaments appartenant à cette classe.

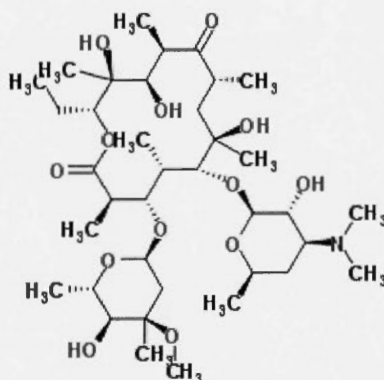
Parmi l'ensemble de ces produits, nous retiendrons en particulier l'érythromycine et l'amoxicilline. Ces deux médicaments ont été choisis puisqu'ils sont les deux antibiotiques les plus consommés au niveau mondial.

#### 0.4.2.1 L'érythromycine

L'érythromycine est un antibiotique appartenant au groupe des macrolides qui est produit par la souche *Saccharopolyspora erythraea* (anciennement *Streptomyces erythraeus*). Sa structure est illustrée par la Figure 0.13. L'érythromycine est un médicament basique, connu sous le nom chimique d'érythromycine octadecanoate. Il est largement utilisé pour le traitement d'une variété de maladies infectieuses, y compris les infections des voies respiratoires supérieures et inférieures. Comme tous les médicaments appartenant au groupe des macrolides, l'érythromycine agit par inhibition de la synthèse des protéines, en se liant à la sous-unité 50S du ribosome. Il n'affecte pas la synthèse de l'acide nucléique. Après son administration par voie orale, l'érythromycine est largement distribuée dans l'organisme. Ce médicament diffuse à travers les tissus (à l'exception du liquide céphalo-rachidien) et se concentre dans les mieux vascularisés (poumons, foie, reins, os, etc.) et les phagocytes (Bahal et Nahata, 1992).

La biodisponibilité de l'érythromycine est d'environ 25 % d'une dose orale (Schentag et Ballow, 1991) et sa demi-vie est courte; elle est de l'ordre de 1,5 h à 2 h. Son taux de liaison aux protéines plasmatiques varie de 65 % à 90 % (Prandota *et al.*, 1980).

L'érythromycine est métabolisée dans le foie par le CYP3A4 pour former un dérivé capable de s'y lier avec une forte affinité. Ce médicament est éliminé principalement par le foie et marginalement par les reins (Austin *et al.*, 1980; Chelvan *et al.*, 1979; Kroboth *et al.*, 1982). Moins de 5 % de la dose administrée est excrétée sous forme active dans l'urine.



**Figure 0.13** Structure de l'érythromycine (<http://www.chemspider.com>).

#### 0.4.2.2 L'amoxicilline

L'amoxicilline est une nouvelle molécule de pénicilline semi-synthétique avec un spectre antibactérien similaire à l'ampicilline (Handsfield *et al.*, 1973). Sa structure est illustrée par la Figure 0.14. L'amoxicilline fait partie de la famille des bêta-lactamates. C'est un bactéricide actif pour les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. L'amoxicilline agit en interférant dans la synthèse de la paroi cellulaire en se liant de manière covalente à la transpeptidase ; empêchant ainsi la synthèse du peptidoglycane qui est l'élément principal de la paroi bactérienne.

Après son administration par voie orale, l'amoxicilline est rapidement absorbée par le tractus gastro-intestinal et demeure stable en présence de l'acide gastrique. Les concentrations sanguines maximales sont atteintes 1 h à 2 h après son ingestion.

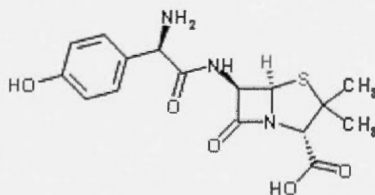
L'amoxicilline diffuse rapidement dans la plupart des tissus du corps et des fluides, à l'exception du liquide céphalo-rachidien. Le taux de liaison de ce médicament aux protéines plasmatiques est faible; environ 20 % (Smyth *et al.*, 1981). L'amoxicilline

est partiellement biotransformée en métabolites microbiologiquement inactifs. Le produit parent et les métabolites sont ensuite rapidement éliminés dans l'urine. Environ 60 % de la dose administrée par voie orale est excrétée dans les urines dans les 6 h à 8 h. De petites quantités du médicament sont éliminées dans les fèces et la bile (Smyth *et al.*, 1981).

#### 0.4.3 Les antidiabétiques

Ces médicaments sont utilisés par les personnes atteintes de diabète. Ils agissent en abaissant le taux de glycémie dans le sang. Les antidiabétiques peuvent agir de plusieurs façons :

- En stimulant le pancréas pour produire plus d'insuline.
- En augmentant la sensibilité des tissus à l'action de l'insuline pour la rendre plus efficace, tout en diminuant la production hépatique de glucose.
- En inhibant l'action de certains enzymes au niveau de l'intestin, tout en diminuant la quantité de sucre absorbée par l'organisme.



**Figure 0.14** Structure de l'amoxicilline (<http://www.chemspider.com>).

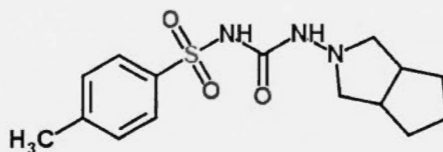
Il existe différents types d'antidiabétiques et leur utilisation dépend de la nature du diabète, de l'âge et de la condition médicale de la personne.

#### 0.4.3.1 Le gliclazide

Le gliclazide, ou le 1-(4-méthylbenzènesulfonyl)3-(3-azabicyclo [3.3.0])urée, est un sulfonylurée appartenant aux médicaments de deuxième génération, qui est largement prescrit pour le traitement du diabète de type 2. Il agit en stimulant la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas en les sensibilisant à l'action du glucose. Sa structure est illustrée par la Figure 0.15. Il est utilisé comme agent hypoglycémiant oral (Krentz et Bailey, 2005; Palmer et Brogden, 1993). Le gliclazide est rapidement absorbé par le tractus gastro-intestinal. Les concentrations sanguines maximales sont atteintes 4 h à 6 h après son administration. Une fois absorbé, il est rapidement distribué dans le liquide extracellulaire et se retrouve dans le foie, les reins, la peau, les poumons, les muscles et les tissus cardiaques (Obaid *et al.*, 2004). Il traverse même le placenta et circule dans le système sanguin du fœtus. Son faible volume apparent de distribution est dû à son taux élevé de liaisons protéiques (94 %) (Davis *et al.*, 2000).

Le gliclazide est métabolisé dans le foie principalement par les CYP2C9 (Park *et al.*, 2003) et CYP2C19 (Yao *et al.*, 2009). Plusieurs métabolites résultent de cette biotransformation, dont les trois principaux sont : le 6 $\beta$ -hydroxygliclazide, le méthylhydroxygliclazide et le carboxygliclazide. Aucun des métabolites du gliclazide ne présente une activité hypoglycémiante. Environ soixante-dix pour cent (70 %) de la dose administrée du gliclazide est excrétée lentement dans l'urine. Le





**Figure 0.15** Structure du gliclazide (<http://www.chemspider.com>).

méthylhydroxygliclazide et le carboxygliclazide représentent 30 % et le 6 $\beta$ -Hydroxygliclazide 11 % des métabolites excrétés dans l'urine (Oida *et al.*, 1985; Taylor *et al.*, 1996). L'élimination fécale représente environ 11 % de la dose administrée. L'excrétion de ce médicament est généralement complète 144 h après son administration (Obaid *et al.*, 2004).

#### 0.4.4 Les antihistaminiques

Les antihistaminiques sont des médicaments utilisés pour réduire ou éliminer les effets de l'histamine (un médiateur chimique endogène libéré lors des réactions allergiques). Ils bloquent les récepteurs de l'histamine situés sur différents types de cellules. Il existe deux types d'antihistaminiques :

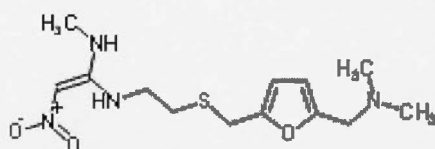
- Les antihistaminiques H1 qui sont utilisés dans le traitement de cas d'allergie où l'histamine joue un rôle de médiateur. Ils agissent en bloquant les récepteurs

d'histamine qui se trouvent sur les cellules des vaisseaux, des intestins et des bronches.

- Les antihistaminiques H<sub>2</sub> qui sont considérés comme des antagonistes des récepteurs à l'histamine du type 2. Ils agissent au niveau des cellules pariétales de l'estomac pour diminuer la sécrétion acide. En effet, l'histamine qui est libéré par les cellules entérochromaffines de la muqueuse gastrique active les récepteurs histaminiques H<sub>2</sub>. Ceci provoque une augmentation du taux de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire et de la sécrétion acide. Cette dernière est assurée par une pompe à protons H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, qui catalyse l'échange entre les ions H<sup>+</sup> intracellulaires et les ions K<sup>+</sup> extracellulaires. Les antagonistes des récepteurs H<sub>2</sub>, qui sont actuellement disponibles, agissent en entrant en compétition de façon réversible avec l'histamine pour l'occupation des sites récepteurs H<sub>2</sub>. Parmi les médicaments appartenant à cette famille on retrouve la ranitidine et la cimétidine.

#### 0.4.4.1 La ranitidine

La ranitidine, dont le nom chimique est le N-[2-[[[5-[(diméthylamino)méthyl]-2-furanyl]méthyl]thio]éthyl]-N'-méthyl-2-nitro-1, 1-éthène-diamine, est un antagoniste de l'histamine au niveau des récepteurs H<sub>2</sub>. Sa structure est illustrée par la Figure 0.16. Il inhibe compétitivement l'histamine au niveau des récepteurs H<sub>2</sub> de manière réversible, y compris ceux sur les cellules gastriques de l'estomac. Par conséquent, ce médicament inhibe à la fois la sécrétion d'acide gastrique basale, ainsi que celle provoquée par l'histamine (Bohman *et al.*, 1980). Son action est relativement longue.



**Figure 0.16** Structure de la ranitidine (<http://www.chemspider.com>).

Après administration orale, 50 % de la dose est rapidement absorbée par le corps et sa biodisponibilité est d'environ 50 %. Chez l'humain, le taux de liaison aux protéines sériques se situe entre 10 % et 19 %. La demi-vie d'élimination de ce médicament est d'environ 3 h et son volume de distribution est de 1,4 L/kg. L'absorption de la ranitidine n'est pas affectée par la présence ou non de la nourriture dans l'estomac.

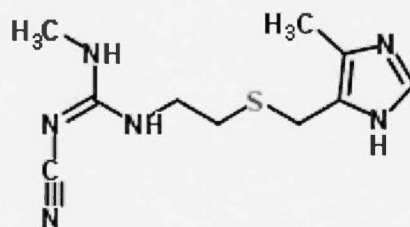
La ranitidine est excrétée principalement par les reins (80 % à 85 %) (via la filtration glomérulaire et la sécrétion tubulaire) et par le foie, sous forme de produit inchangé et de métabolites inactifs. La N-déméthylation est la voie principale de sa biotransformation et la N et/ou S-oxydation en est la voie secondaire. L'urine, la voie principale d'élimination, assure l'excrétion de 30 % de la dose administrée sans aucune biotransformation, 4 % sous forme de N-oxyde et 1 % de S-oxyde (Garg *et al.*, 1981).

#### 0.4.4.2 La cimétidine

La cimétidine, dont le nom chimique est le N''-cyano-N-méthyl-N'-(2(((5-méthyl-1Himidazol-4-yl)méthyl)thio)éthyl)guanidine, est un substitut de l'imidazole. Sa structure est illustrée par la Figure 0.17. C'est une molécule basique très soluble dans l'eau et ceci se traduit par sa présence à des concentrations élevées dans les fluides biologiques; notamment le fluide céphalo-rachidien (Somogyi et Gugler, 1983). La cimétidine a un effet antagoniste spécifique sur l'histamine au niveau des récepteurs H<sub>2</sub>. En effet, cette molécule se lie principalement aux récepteurs de l'histamine H<sub>2</sub> des cellules pariétales et par conséquent elle inhibe la sécrétion d'acide gastrique stimulée, entre autres, par l'histamine, la penta-gastrine, l'acétylcholine, l'insuline et la nourriture (Broghden *et al.*, 1978).

Après son administration par voie orale, l'absorption de la cimétidine a lieu de manière discontinue dans l'intestin. Sa biodisponibilité est d'environ 60 % et sa demi-vie est de l'ordre de 2 h (Somogyi et Gugler, 1983). Après son absorption, la cimétidine est distribuée rapidement dans les différents organes ; principalement les reins, les poumons et les muscles. La cimétidine présente un taux de liaison aux protéines plasmatiques faible : de l'ordre de 20 % (Somogyi et Gugler, 1983).

Chez l'humain, la cimétidine est métabolisée dans le foie par hydroxylation oxydative et par conjugaison. La majeure partie de la cimétidine est excrétée dans l'urine sous forme inchangée (70 %) (Somogyi et Gugler, 1983). La voie urinaire assure aussi l'élimination des deux principaux métabolites de la cimétidine : un conjugué avec l'acide glucuronique (la cimétidine-N-glucuronide) et le S-oxyde (diméthyl cimétidine), qui représentent respectivement environ 18 % et 11 % de la dose administrée.



**Figure 0.17** Structure de la cimétidine (<http://www.chemspider.com>).

#### 0.4.5 Les anticonvulsivants

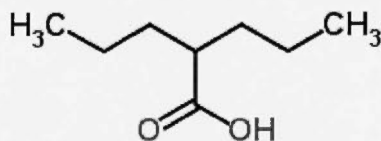
Les anticonvulsivants sont des médicaments agissant contre les convulsions, qu'elles soient d'origine épileptique ou dues à la fièvre. Ce sont des médicaments préventifs et ne sont efficaces que s'ils atteignent une certaine concentration dans le sang, qui doit être maintenue pour éviter les crises. Ils agissent sur le système nerveux central en diminuant l'activité neuronale. Ceci peut être accompli de deux manières (MacDonald et Olsen, 1994; Rogers *et al.*, 1994; Study et Barker, 1981) :

- En stimulant l'effet inhibiteur du neurotransmetteur GABA, en se liant sur un site spécifique dans la sous-unité gamma du récepteur correspondant.
- En bloquant les canaux voltage-dépendants de sodium excitateurs des neurones, tel que la carbamazépine.

#### 0.4.5.1 L'acide valproïque

L'acide valproïque (VPA, l'acide 2-propylpentanoïque ou l'acide dipropylacétique) est un acide carboxylique formé d'une chaîne composé de 8 carbones. Sa structure est illustrée par la Figure 0.18. C'est un acide faible avec un pKa de 4,95 (Löscher, 1999). L'acide valproïque est prescrit comme médicament antiépileptique à large spectre d'action pour traiter de nombreuses formes d'épilepsie et types de crises, touchant les enfants ou les adultes (Löscher, 1999). L'acide valproïque agit en modifiant la concentration de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) qui joue le rôle de neurotransmetteur (Perucca, 2002; Shorvon, 1990). Plusieurs études montrent que l'administration de l'acide valproïque induit une augmentation des niveaux de GABA, ce qui favorise la propagation de ce neurotransmetteur dans des endroits spécifiques du cerveau (Owens et Nemeroff, 2003). De plus, l'acide valproïque peut exercer un effet direct sur les canaux de potassium de la membrane neuronale (Porter et Meldrum, 2001).

Après son administration par voie orale, l'acide valproïque est rapidement absorbé. Sa concentration plasmatique atteint son maximum 1 h à 4 h après son ingestion (Al-Shareef *et al.*, 1997; Klotz et Antonin, 1977). Toutefois, le délai requis pour atteindre ce maximum peut être affecté par la présence ou non de nourriture dans l'estomac. Il peut avoir lieu, dans certains cas, jusqu'à 18 h après l'administration d'une dose thérapeutique. La biodisponibilité de ce médicament est d'environ 80 % (Silva *et al.*, 2008). L'acide valproïque présente un taux élevé de liaison aux protéines plasmatiques ; de l'ordre de 90 %. Sa demi-vie varie de 8 h à 12 h et son volume de distribution est de 0,4 L/kg.



**Figure 0.18** Structure de l'acide valproïque (<http://www.chemspider.com>).

Une faible quantité (environ 3 %) de la dose administrée d'acide valproïque est excrétée sous forme inchangée. Le restant est biotransformé via des réactions de la phase I qui sont principalement la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et la  $\omega$ -hydroxylation. Alors que celles de la phase II consistent en des réactions de glucuronidation et de conjugaison avec le glutathion.

Les isoformes CYP2C9 et CYP2A6 (Sadeque *et al.*, 1997), ainsi que CYP2B6 (Abbott et Anari, 1999) sont les principaux enzymes impliqués dans les réactions d'oxydation de la phase I. L'acide valproïque et ses métabolites sont excrétés principalement dans l'urine, avec des traces dans la bile, les fèces et l'air expiré (Silva *et al.*, 2008). La voie urinaire assure l'élimination de 30 % à 50 % de la dose absorbée métabolisée en conjugués de glucuronide, ainsi que 40 % biotransformée par la réaction de  $\beta$ -oxydation mitochondriale et 15 % à 20 % sous forme de métabolites produits par les autres voies de biotransformation de l'acide valproïque (Silva *et al.*, 2008).

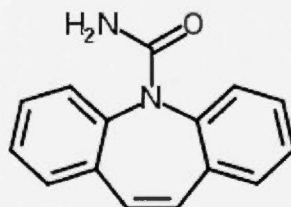


#### 0.4.5.2 La carbamazépine

La carbamazépine ( $C_{15}H_{12}N_2O$ , CBZ, (1, 5Hdbenzo[b,f]azepine-5-carboxamide)) est un composé tricyclique qui est très utilisé dans le traitement des crises épileptiques partielles, des troubles bipolaires, du déficit de l'attention avec hyperactivité (TDAH), ainsi que pour la réduction des douleurs de la névralgie du trijumeau et comme stabilisateur d'humeur. Sa structure est illustrée par la Figure 0.19. La carbamazépine agit en se liant aux canaux de  $Na^+$  et ralentit le renouvellement de son inactivation. De plus, ce médicament inhibe l'entrée du  $Ca^{2+}$  dans les membranes synaptiques et réprime, par conséquent, la fonction synaptique.

Après son administration par voie orale, la carbamazépine est absorbée lentement par le tractus gastro-intestinal. Par la suite, elle est rapidement distribuée dans le corps et biotransformée en métabolites (Lertratanangkoon et Horning, 1982). L'absorption de ce médicament par le corps est lente. Il présente un taux de liaisons protéiques de 75 % à 78 % et son volume de distribution varie de 0,8 à 2,0 L/kg.

La carbamazépine est métabolisée dans le foie par plusieurs enzymes du CYP450. Ce médicament est oxydé par le CYP3A4 principalement en 10, 11-époxyde carbamazépine (Kerr *et al.*, 1994). En plus du CYP3A4, les CYP2C8, CYP1A2 ainsi que CYP2A6 jouent un rôle mineur dans la biotransformation du carbamazépine en époxyde (Caraco *et al.*, 1995; Pelkonen *et al.*, 2001a; Pelkonen *et al.*, 2001b). Ce dernier est hydrolysé principalement en 10, 11-trans dihydrodiol carbamazépine, avant d'être excrété dans l'urine (Faigle et Feldman, 1995). La biotransformation de la carbamazépine produit aussi d'autres métabolites mineurs, tels que le 1-hydroxyméthyl-10-carbamoxyl acridan, le 3-hydroxy carbamazépine et le 2-hydroxy carbamazépine.



**Figure 0.19** Structure de la carbamazépine (<http://www.chemspider.com>).

La carbamazépine est connue pour être un inducteur de plusieurs CYP450 (Faigle et Feldman, 1995). La vitesse d'élimination de ce médicament est très lente avec une demi-vie de 13 h à 17 h. Seulement 5 % de la dose de ce médicament est excrétée sous forme inchangée.

**Tableau 0.4 Voies métaboliques et enzymes impliqués dans le métabolisme des médicaments sélectionnés**

Médicaments	Voies métaboliques	Enzymes impliqués dans le métabolisme	Interactions avec certains enzymes
Acide acétylsalicylique	Glucuronidation	UGT2B7	N/D
	Hydroxylation	CYP2C19, CYP3A	N/D
Acétaminophène	Glucuronidation	UGT1A1, UGT1A6, UGT1A9	Induit certains CYP 450 (Plewka <i>et al.</i> , 2000)
	Sulfatation	Sulphotransférase	N/D
	Oxydation	CYP2E1, CYP1A2, CYP2A5, CYP2A6, CYP2G1, CYP3A4	Induit certains CYP 450 (Zielińska-Psuja <i>et al.</i> , 2001; Zielińska-Psuja <i>et al.</i> , 1999)
	Conjugaison avec le glutathion	GST	N/D
	Oxydation	N/D	Inhibe le CYP2C9

Médicaments	Voies métaboliques	Enzymes impliqués dans le métabolisme	Interactions avec certains enzymes
Acide valproïque	Glucuronidation	UGT1A6, UGT1A8, UGT2B7	Inhibe certains UGT (Ethell <i>et al.</i> , 2003; Kiang <i>et al.</i> , 2005)
Cimétidine	Sulfatation	Sulphotransférase	N/D
	Oxydation	N/D	Inhibe les CYP1A2, CYP2E1, CYP2C6 et CYP2C11 (Brogden <i>et al.</i> , 1978; Kiang <i>et al.</i> , 2005; Lefranc <i>et al.</i> , 2006; Levine <i>et al.</i> , 1998; Szutowski <i>et al.</i> , 2002)
	Glucuronidation	N/D	N/D
Carbamazépine	Glucuronidation	UGT2B7	Inhibe certains UGT
	Hydroxylation	N/D	N/D
	Oxydation	CYP3A4, CYP2C8, CYP1A2, CYP3A5, CYP3A7	Induit le CYP1A2

Médicaments	Voies métaboliques	Enzymes impliqués dans le métabolisme	Interactions avec certains enzymes
Diclofenac	Glucuronidation	UGT2B7	Inhibe certains UGT (Kiang <i>et al.</i> , 2005)
	Hydroxylation	CYP2C9, CYP3A4	Inhibe le CYP2E1 (Tassaneeyakul <i>et al.</i> , 1998)
	Sulfatation	Sulphotransférase	N/D
Ibuprofène	Oxydation	CYP2C9, CYP2C8	N/D
	Glucuronidation	UGT1A3, UGT1A9, UGT2B7, UGT2B17	N/D
	Oxydation	CYP1A2, CYP2C9	N/D
L'amoxicilline	Oxydation	CYP2C19	N/D
L'érythromycine	Oxydation	CYP3A4, CYP3A5, CYP4F11	N/D
Le gliclazide	N/D	N/D	N/D
L'acide méfénamique	Oxydation	CYP2C9	N/D

Médicaments	Voies métaboliques	Enzymes impliqués dans le métabolisme	Interactions avec certains enzymes
Le ranitidine	Oxydation	CYP1A2	Inhibe certains UGT (Itoh <i>et al.</i> , 2000)
Le naproxène	Oxydation	CYP1A2, CYP2C9	Inhibe certains GST
Sulpha-salazine	N-acétylation	N/D	N/D
	Hydroxylation	N/D	N/D
	Glucuronidation	N/D	N/D

N/D : information non disponible.

## 0.5 Les interactions toxicologiques

Généralement, la toxicité d'un produit est presque exclusivement étudiée indépendamment de celle des autres substances. Bien que cette approche soit indispensable pour connaître le profil toxicologique d'un élément isolé et déterminer les seuils de sa toxicité à partir des relations doses-réponses, elle ne permet pas cependant de comprendre les mécanismes d'interactions et les risques associés à l'exposition à des mélanges de substances (Krishnan *et al.*, 1994a; Krishnan *et al.*, 1994b). La pollution du sol, de l'eau et de l'air occasionne chez l'être humain ainsi que chez les animaux une exposition quasi permanente à des mélanges de substances, qui peuvent être entre autres des contaminants chimiques, mais aussi des médicaments. Différentes formes d'interactions toxicologiques pourraient résulter de cette exposition. Une interaction est toute modification, occasionnée par une autre substance, de l'effet connu résultant de l'exposition à un composé. Les interactions peuvent être toxicodynamiques ou toxicocinétiques et les effets cliniques de celles-ci peuvent être antagonistes, additifs, synergiques, potentialisateurs ou idiosyncrasiques. Ces interactions peuvent occasionner des effets toxiques qui pourraient être graves.

### 0.5.1 Les interactions toxicodynamiques

Les interactions toxicodynamiques englobent tous les processus qui déterminent la relation entre la dose biologiquement effective et les effets observés. Il s'agit d'une action directe ou indirecte au niveau d'un récepteur ou d'une fonction, sans modification concomitante des concentrations des produits impliqués. Ces interactions peuvent être compétitives (sur le même récepteur), ou non compétitives (sur des récepteurs indépendants ou interdépendants dont l'activation aboutit à une fonction ou à une activité commune). Les conséquences de ces interactions peuvent



être une diminution (antagonisme) ou une augmentation (potentialisation ou synergie) des effets désirables ou indésirables (Ben Amar, 2004; Mojaverian *et al.*, 1987).

#### 0.5.1.1 Les interactions supra-additives

Lorsque l'action résultante d'une exposition à deux substances est égale à la somme des effets de chacune d'elle prise séparément, l'effet est qualifié d'additif ( $1+1=2$ ) et aucune interaction n'est observée. Par contre, lorsque l'effet d'une substance augmente de façon significative en présence d'une autre, il y a alors une interaction qui est qualifiée de supra-additive. Cette augmentation peut affecter la durée de l'action et/ou l'intensité de l'effet observé. Dans le cas où le résultat de leur association est supérieur à la somme des effets de chacune des substances agissant séparément, il s'agit alors d'une interaction synergique ( $2+3=8$ ). L'effet découlant d'une coexposition à l'éthanol et le tétrachlorure de carbone est un exemple d'une telle interaction (Bosma *et al.*, 1988). Finalement, une interaction potentialisatrice implique deux substances ayant des modes d'action différents et dont l'une est sans effet lorsqu'administrée seule, mais le résultat de leur co-administration est supérieur aux effets individuels de ces composés ( $0+3=6$ ) (Ben Amar, 2004). L'exposition simultanée à l'isopropanol et au tétrachlorure de carbone est un exemple d'interactions potentialisatrices (Côté *et al.*, 1974).

#### 0.5.1.2 Les interactions antagonistes

L'antagonisme se manifeste par une diminution de l'effet d'un composé occasionné par la présence d'un autre. Cette diminution peut être partielle (antagonisme partiel) et atteint son maximum lorsqu'un des produits annule l'effet de l'autre (antagonisme

total). Lorsque l'association des effets des deux composés est inférieure à celui de l'un ou de l'autre de ces constituants pris séparément, c'est un antagonisme partiel. Si les effets des deux composés se compensent et s'annulent, il s'agit d'un antagonisme total. Dans le cas où les interactions antagonistes ciblent les mêmes récepteurs, l'antagonisme est qualifié de compétitif. Celui-ci sera désigné d'antagonisme physiologique s'il s'agit de récepteurs différents (Ben Amar, 2004; Mojaverian *et al.*, 1987).

### 0.5.2 Les interactions toxicocinétiques

Les interactions toxicocinétiques sont celles qui touchent la concentration d'un composé et potentiellement ses effets sous l'influence d'un autre. Elles englobent tous les processus qui contrôlent le transport du composé, à partir de son site d'absorption jusqu'à son site d'action ou d'excrétion. Différents paramètres peuvent affecter les caractéristiques du processus cinétique, tels que la biodisponibilité, le volume de distribution, la clairance et la demi-vie. Toute modification à une de ces caractéristiques peut entraîner des changements dans les concentrations plasmatiques et par conséquent accroître l'effet principal recherché de la molécule et/ou le risque d'effets secondaires (Baxter *et al.*, 2008; Ben Amar, 2004).

#### 0.5.2.1 L'absorption

La présence de deux ou plusieurs substances peut en affecter l'absorption, soit par la modification de la vitesse et/ou de la quantité totale absorbée. Ces modifications peuvent résulter d'une altération des propriétés physico-chimiques des substances, de la motilité gastro-intestinale et/ou du vidange gastrique, d'une modulation du pH

gastrique ou intestinal, ou d'une inhibition des transporteurs intestinaux actifs. Cette perturbation se traduit par une diminution ou une augmentation de l'absorption (Baxter *et al.*, 2008). Par exemple, la prise d'antiacide augmente le pH gastrique, ce qui a pour effet de limiter l'absorption de certaines autres substances, tel que l'atazanavir, qui est un médicament antirétroviral.

#### 0.5.2.2 La distribution

Les substances qui circulent dans le sang peuvent être sous deux formes : liées aux protéines plasmatiques, ou libres dissoutes dans le plasma. C'est seulement sous cette dernière forme qu'elles peuvent être actives. Par compétition, certaines substances peuvent déplacer d'autres de leurs liaisons aux protéines plasmatiques, augmentant ainsi la quantité de la forme libre et affectant par conséquent l'activité des éléments délogés (Baxter *et al.*, 2008). Par exemple, les anticoagulants et les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont deux médicaments dont l'effet de l'un affecte la fraction libre de l'autre. L'interaction entre ces deux médicaments, qui se manifeste par une compétition pour les protéines plasmatiques, a pour conséquence d'augmenter le risque d'hémorragie interne.

#### 0.5.2.3 Le métabolisme hépatique

Lorsque deux ou plusieurs substances sont biotransformées par les mêmes systèmes enzymatiques, des interactions toxicocinétiques peuvent avoir lieu. En effet, certaines substances sont des inducteurs enzymatiques, alors que d'autres sont des inhibiteurs. Certains substrats sont capables d'augmenter l'expression de certains gènes codant pour des enzymes et plus spécifiquement ceux du CYP450. Ils occasionnent par

conséquent une augmentation de leurs activité enzymatique, ou un ralentissement de la dégradation et/ou de l'élimination des enzymes du CYP450 (Michaud et Turgeon, 2002). Il s'agit dans ce cas d'une induction. Celle-ci se traduit par une augmentation de la biotransformation de la substance, ce qui entraîne une disparition plus rapide du produit parent. L'effet inducteur est peu spécifique. Généralement l'induction n'est pas rapide et nécessite une phase de latence avant que son effet ne commence à se manifester. Cette phase peut varier de quelques heures jusqu'à 21 jours, dépendamment de l'inducteur. L'induction ne cesse pas immédiatement dès la disparition de la substance inductrice, elle s'estompe plutôt de façon progressive (Mura, 2011). Par exemple, le phénobarbital est un antiépileptique qui induit certains enzymes du CYP450 impliqués dans la biotransformation de la cyclosporine, qui est un médicament immunosuppresseur. Cette interaction a pour effet de réduire l'effet thérapeutique de ce dernier.

Certains composés peuvent se lier à un enzyme entraînant soit un ralentissement de la transformation (inhibition partielle), ou l'arrêt total de celle-ci (inhibition totale). Cette inhibition occasionne une augmentation des concentrations plasmatiques du produit parent, ainsi que de son temps de transit précédant son élimination. L'inhibition peut être réversible ou irréversible. Dans le premier type, le substrat se lie à l'enzyme avec des liaisons de faible énergie ce qui en rend la destruction facile ; l'enzyme pourra ainsi retrouver son activité normale. Dans une inhibition irréversible, le composé se lie à l'enzyme avec une liaison covalente, ce qui rend l'inactivation permanente. Par exemple, l'érythromycine se lie de manière covalente au CYP3A4 et l'inactive de façon permanente. Cet effet persiste même lorsque ce médicament a cessé d'être administré. Dans le cas d'une inhibition réversible, l'inhibiteur peut se lier à l'enzyme sous plusieurs formes (Goldberg, 2003; Nelson et Cox, 2004). S'il en a la capacité de se lier au site catalytique de l'enzyme, l'inhibition sera qualifiée de compétitive. Elle se manifeste par une hausse de la valeur du  $K_m$  apparent, sans

toutefois affecter la vitesse maximale de la réaction (Goldberg, 2003; Nelson et Cox, 2004). La vitesse de celle-ci peut être calculée par l'équation (0.1) :

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_m \left( 1 + \frac{[I]}{[K_i]} \right) + [S]} \quad (0.1)$$

où  $V$  désigne la vitesse enzymatique,  $V_{\max}$  est la vitesse enzymatique maximale,  $[S]$  est la concentration du substrat,  $K_m$  est la constante d'affinité de l'enzyme pour le substrat,  $[I]$  est la concentration de l'inhibiteur et  $[K_i]$  représente la constante d'inhibition.

Dans la deuxième forme d'inhibition, l'inhibiteur se lie aussi bien à l'enzyme libre qu'au complexe enzyme-substrat avec la même affinité. L'enzyme présente un site de fixation, aussi bien à l'inhibiteur qu'au substrat et l'ancrage à l'un ou l'autre n'a aucun effet sur la conformation de l'enzyme. Ceci se manifeste par une diminution de la vitesse maximale de la réaction, mais sans aucun effet sur l'affinité de l'enzyme (Goldberg, 2003; Nelson et Cox, 2004) Cette inhibition est qualifiée de non-compétitive. La vitesse de la réaction peut être calculée par l'équation (0.2) :

$$V = \frac{V_{\max}}{\left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \left( \frac{[S]}{K_m} + 1 \right)} \quad (0.2)$$



La troisième forme d'inhibition réversible est caractérisée par la liaison de l'inhibiteur au complexe formé par l'enzyme et le substrat (ES), constituant ainsi un nouveau complexe comprenant l'enzyme, le substrat et l'inhibiteur (ESI). Ce nouveau complexe formé est non productif. Dans ce type d'inhibition, l'inhibiteur ne peut pas se fixer directement sur l'enzyme libre. Il a besoin au préalable que la liaison entre l'enzyme et son substrat soit établie. Ceci induit un changement de la conformation de l'enzyme, permettant ainsi la fixation de l'inhibiteur. Cette inhibition est qualifiée d'incompétitive. Elle se traduit par une baisse qui affecte à la fois la vitesse maximale apparente de la réaction, ainsi que la valeur du  $K_m$  apparent (Goldberg, 2003; Nelson et Cox, 2004). La vitesse de réaction peut être calculée par l'équation (0.3) :

$$V = \frac{[S] \times \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}}{[S] + \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}} \quad (0.3)$$

L'inhibition peut occasionner une augmentation de la toxicité, ou des effets indésirables de certaines substances. Par exemple, l'administration concomitante de la cimétidine et de la théophylline entraîne un ralentissement affectant les voies de biotransformation métabolique de ce dernier, occasionnant ainsi une augmentation des effets indésirables de ce médicament. Celui-ci appartient à la famille des bronchodilatateurs et il est prescrit pour soigner certaines affections respiratoires comme l'asthme, l'emphysème et la bronchite chronique.

#### 0.5.2.4 L'excrétion

L'élimination de certaines substances peut être affectée par d'autres composés présents dans l'organisme. S'il s'agit d'une substance toxique, dans certaines conditions son séjour dans l'organisme pourrait être prolongé et les effets qui en résultent peuvent être augmentés. La perturbation de l'élimination peut toucher un ou plusieurs niveaux du système d'excrétion. Plus spécifiquement, la filtration glomérulaire, la sécrétion et la réabsorption tubulaire. L'interaction touchant le premier niveau se traduit par une accélération de la filtration glomérulaire et par une accentuation de l'excrétion des produits parents, suite à un déplacement dans leurs liaisons protéiques (Baxter *et al.*, 2008). Dans le cas où deux composés utilisent le même transporteur de sécrétion tubulaire, la compétition entre ces substances pourrait entraîner une diminution de l'élimination de l'un ou des deux (Baxter *et al.*, 2008). Finalement, lorsqu'un composé présent modifie le pH, la proportion des molécules ionisées par rapport à celles non-ionisées de l'autre composé se trouve altérée. Ceci affecte la réabsorption tubulaire de ce dernier, puisque seules les molécules non ionisées sont réabsorbées de façon passive (Baxter *et al.*, 2008). L'administration d'un antiacide, qui augmente le pH et occasionne ainsi une réduction de la réabsorption tubulaire des salicylates, en est un exemple.

#### 0.6 Les interactions toxicologiques impliquant le trichloréthylène

L'exposition au trichloréthylène peut avoir lieu en présence d'autres produits chimiques provenant de la pollution environnementale, ou d'une consommation médicamenteuse. Ce mélange de substances, qui sont parfois biologiquement actifs, peut influencer le métabolisme du trichloréthylène dans le foie et affecter ainsi sa pharmacocinétique et/ou sa pharmacodynamique et donc sa toxicité dans le tissu



cible. Malgré une évidence claire de l'existence d'interactions toxicologiques entre le trichloréthylène et d'autres composées, peu de travaux se sont intéressés à leurs mécanismes d'action.

Les résultats de Dobrev *et al.* (2001) montrent que l'exposition au trichloréthylène, en combinaison avec le tétrachloréthylène et le trichloroéthane, occasionne une augmentation de 15 % de la concentration sanguine de TCE, comparativement à celle résultant de l'exposition à cette substance seule. Ceci s'explique par une inhibition compétitive au niveau des enzymes du CYP450 (enzyme responsable de la voie d'oxydation) (Barton *et al.*, 1995). D'autre part, plusieurs études ont démontré que, l'exposition simultanée au trichloréthylène en combinaison avec d'autres substances chimiques, affecte la pharmacocinétique d'au moins un des composés et modifie la dosimétrie dans l'organe cible (El-Masri *et al.*, 1996a; El-Masri *et al.*, 1996b; Pelekis et Krishnan, 1997; Tardif et Charest-Tardif, 1999; Tardif *et al.*, 1995; Tardif *et al.*, 1993). Par exemple, les travaux d'Ikeda (1974) ont établi que le toluène interfère dans le métabolisme du trichloréthylène en occasionnant une inhibition non compétitive des enzymes de cette biotransformation.

Des études plus récentes ont identifié des interactions entre le TCE et certains médicaments. Les travaux de Plewka *et al.* (2000) ont démontré que la présence d'acétaminophène (APAP) lors de l'exposition au TCE, induit une augmentation du taux de CYP450. L'APAP est un médicament qui est fréquemment utilisé comme analgésique. À des doses thérapeutiques, ce médicament est métabolisé principalement par glucuronidation et sulfatation avec des taux respectifs de 60 % et 35 %. Alors que sa biotransformation par voie d'oxydation, impliquant le cytochrome P450 (CYP2E1), ne représente que 5 % (Manyike *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 1992; Prescott, 1983). La présence d'acétaminophène stimule les enzymes du CYP450 et favorise ainsi la voie d'oxydation du TCE. Ceci pourrait occasionner une

augmentation de la formation des métabolites du TCE (CH, TCA, DCA et TCOH) et entraîner une aggravation des effets toxiques.

L'acide acétylsalicylique (ASA) est un médicament possédant des propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. Il est couramment prescrit pour le traitement des maladies rhumatismales, ainsi que la prophylaxie cérébrovasculaire (Needs et Brooks, 1985). À des doses élevées, l'acide acétylsalicylique est catalysé par le CYP450 et génère un métabolite réactif intermédiaire capable de se lier de façon covalente aux protéines (Kyle et Kocsis, 1986). Les travaux de recherche de Zielińska-Psuja *et al.* (1999) et Zielińska-Psuja *et al.* (2001) indiquent que l'ASA stimule principalement les enzymes du CYP450 et diminue l'excrétion des métabolites du trichloréthylène (TCA et TCOH). Ces mêmes auteurs montrent que l'ASA stimule non seulement le CYP450, mais aussi d'autres enzymes, tel que l'UDP-glucuronyl-S-transférase. La stimulation de ce dernier favorise la conjugaison du TCA et du TCOH avec l'acide glucuronique. Ceci contribue à contrer les effets toxiques induits par les métabolites du TCE. Le GSH-S-transférase est parmi les autres enzymes qui peuvent être stimulés par l'ASA, mais dont l'action accentue la toxicité du TCE. Ceci a lieu en favorisant la voie de conjugaison du composé parent le TCE, en dichlorovinyl-cystéine (DCVC); un métabolite très toxique (Zielińska-Psuja *et al.*, 2001; Zielińska-Psuja *et al.*, 1999).

## OBJECTIFS

Plusieurs facteurs ont le potentiel de moduler la toxicité du trichloréthylène, dont les interactions entre cette substance et d'autres produits chimiques ou pharmaceutiques. Récemment, certaines études ont mis en évidence l'existence de telles interactions entre le trichloréthylène et certains médicaments. Il s'agit, principalement, de l'acide salicylique et de l'acétaminophène. Toutefois, la liste des médicaments évalués et les connaissances reliées aux mécanismes des interactions sont encore limitées.

Les objectifs de cette étude sont donc de :

- Identifier, valider et caractériser *in vitro* chez le rat les interactions métaboliques entre le trichloréthylène et 14 médicaments à consommation courante et couvrant un large spectre de familles thérapeutiques.
- Identifier, valider et caractériser *in vitro* chez l'humain ces mêmes interactions métaboliques et comparer les profils obtenus chez les deux espèces.
- Valider *in vivo* chez le rat les interactions identifiées *in vitro* entre le trichloréthylène et quelques médicaments, qui ont été sélectionnés pour le caractère vraisemblable de leur réponse et les similarités de leurs profils chez l'humain et le rat.

Les familles thérapeutiques et les médicaments correspondants considérés dans cette étude sont :

- Les anti-inflammatoires : l'acétaminophène, l'ibuprofène, l'acide acétylsalicylique, l'acide méfénamique, le naproxène, le diclofénac et la sulfasalazine.
- Les antihistaminiques : la cimétidine et la ranitidine.
- Les anticonvulsivants : l'acide valproïque et la carbamazépine.
- Les antibiotiques : l'amoxicilline et l'érythromycine.
- Les antidiabétiques : le gliclazide.

Cette étude apportera des éléments de réponse concernant l'identification et les mécanismes d'action des interactions entre les médicaments sélectionnés et le trichloréthylène. L'étude *in vitro* chez le rat (chapitre I) et chez l'humain (chapitre II) ne peut pas reproduire tous les processus biologiques impliqués lors d'une co-exposition au TCE et l'un des médicaments sélectionnés. L'étude *in vivo* vient donc compléter celle *in vitro*, toutefois celle-ci est réalisée chez le rat puisque ce genre de recherche est plus difficilement envisageable chez l'humain pour des raisons éthiques. L'objectif de l'étude *in vivo* est de prendre en considération tous les processus de rétablissement d'homéostasie qui ont lieu après les éventuelles perturbations induites par les médicaments, ainsi que les possibles interactions extrahépatiques qui n'auront pu être observées *in vitro*.

Cette étude s'inscrit dans une perspective d'extrapoler les résultats obtenus, pour une meilleure évaluation pour l'humain du risque occasionné par l'exposition simultanée au TCE et l'un des médicaments de cette étude. De cette évaluation du risque découleraient des mesures d'atténuation ou d'élimination de ce risque chez l'humain.

## CHAPITRE I

### MODULATION OF TRICHLOROETHYLENE *IN VITRO* METABOLISM BY DIFFERENT DRUGS IN RATS

Mouna Cheikh Rouhou<sup>1</sup>, Isabelle Rheault<sup>1</sup> and Sami Haddad<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> TOXEN, Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal,  
C.P. 8888 Succ. Centre-ville, Montreal, Canada, H3C 3P8

<sup>2</sup> Département de Santé Environnementale et Santé au Travail, chaire d'analyse et de  
gestion des risques toxicologiques, IRSPUM, Faculté de Médecine, Université de  
Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montreal, Canada, H3C 3J7

Toxicology in Vitro 27 (2013) 34–43

Mouna Cheikh Rouhou : approche expérimentale, développement de la méthode  
expérimentale, réalisation des expériences et rédaction de l'article.

Isabelle Rheault : développement de la méthode expérimentale et support dans la  
réalisation des expériences.

Sami Haddad : approche expérimentale, correction et révision de l'article.

## Abstract

Trichloroethylene (TCE) is a widely used chemical to which humans are frequently exposed. Toxicological interactions with drugs are among factors having the potential to modulate the toxicity of TCE. The aim of this study was to identify metabolic interactions between TCE and 14 widely used drugs in rat suspended hepatocytes and characterize the strongest using microsomal assays (oxidation and/or glucuronidation). The concentrations of TCE and its metabolites, trichloroethanol (TCOH) and trichloroacetate (TCA), were measured by gas chromatography with injection headspace coupled to mass spectrometry (GC-MS). Results in hepatocyte incubations show that selected drugs can be segregated into four groups: group 1: drugs causing no significant interactions (5 drugs: amoxicillin, carbamazepine, ibuprofen, mefenamic acid and ranitidine); group 2: increasing both TCE metabolites (2 drugs: naproxen and salicylic acid); group 3: decreasing both TCE metabolites (5 drugs: acetaminophen, gliclazide, valproic acid, cimetidine and diclofenac) and group 4: affecting only one (2 drugs: erythromycin and sulphasalazine). Naproxen and salicylic acid (group 2) and acetaminophen, gliclazide and valproic acid (from group 3) presented the strongest interactions (i.e. drugs changing metabolite levels by 50 % or more). For group 2 drugs, characterization in rat microsomes confirmed interaction with naproxen only, which was found to partially competitively inhibit TCOH glucuronidation ( $K_i=211.6 \mu\text{M}$ ). For group 3 selected drugs, confirmation was positive only for gliclazide ( $K_i=58 \mu\text{M}$  for TCOH formation) and valproic acid ( $K_i=1215.8 \mu\text{M}$  for TCA formation and  $K_i=932.8 \mu\text{M}$  for TCOH formation). The inhibition was found to be a partial non competitive for both drugs. Our results confirm the existence of interactions between TCE and a variety of widely used drugs. Further efforts are undertaken to determine if these interactions are plausible in humans and if they can impact the risk of toxicity of TCE in medicated population.

**Keywords:** Trichloroethylene, metabolism, interactions, inhibition, rat liver microsomes, rat hepatocytes, metabolic clearance, trichloroethanol, trichloroacetate, drugs, pharmaceuticals.



## 1.1 Introduction

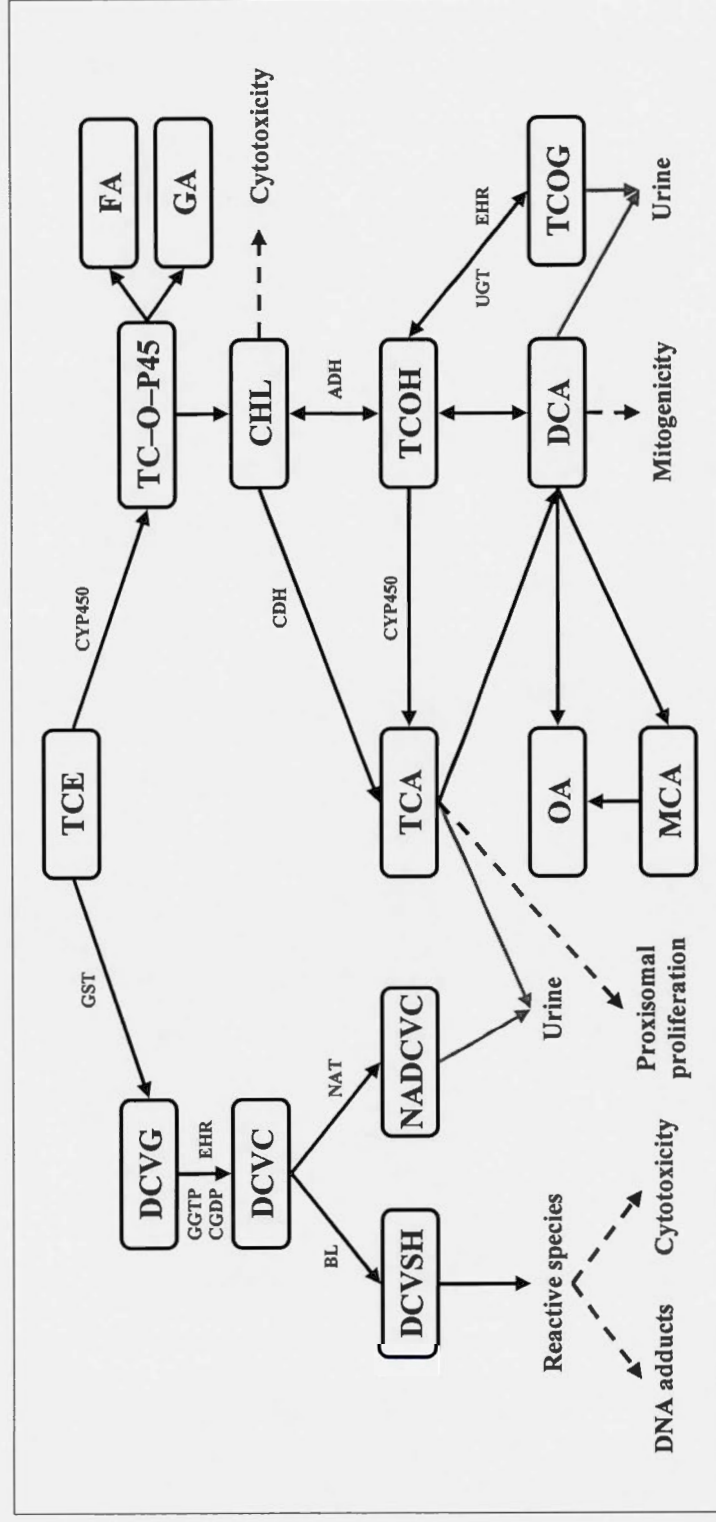
Trichloroethylene (TCE) is a widely used chemical to which humans are frequently exposed. This common organic volatile solvent has a wide spectrum of applications in a variety of industries. For instance, TCE is currently used for metal degreasing and cold cleaning of parts, as low-temperature heat transfer fluid, as solvent in the textile industry and as ingredient in the manufacturing of some products (e.g., paints, adhesives, lubricants). Historically, TCE has also been used as an ingredient in spot removers and cleaning fluids for rugs (Lloyd *et al.*, 1975). In medicine and veterinary practice, trichloroethylene was popular as a general anaesthetic in surgical, dental and obstetrical procedures, as well as a disinfectant and detergent for skin, minor wounds and surgical instruments (IARC, 1979).

Recycling and adequate disposal of this chemical is still a major problem and TCE pollution represents a serious environment hazard. According to the US Environmental Protection Agency (EPA) (1997), an estimated 540 million Kg of TCE are released to the atmosphere and 9.1 million Kg to the ocean each year; which is about 60 % of the world annual production. In the United States of America only, according to the National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) statistics, 3.5 million workers are exposed each year to trichloroethylene. The sources of exposure are numerous. Among others, drinking contaminated water and inhalation of polluted air in workplace and around landfill sites (Ford *et al.*, 1995; James, 1963; Kleinfeld et Tabershaw, 1954; McCarthy et Jones, 1983; Smith, 1966).

The toxicity of TCE to human health has been demonstrated by several studies. The harmful effect of TCE exposure is caused not only by the parent product but also by the complex mixture of metabolites resulting from its biotransformation which is responsible of the worst effects (Barton et Clewell, 2000; Barton et Das, 1996; Bull,

2000; Bull *et al.*, 2002). For instance, the results of Ho *et al.* (2003) reported toxic effects and mechanisms of cell death caused by exposure to chloral hydrate (CHO) in rats liver cells and human lymphocytes. Toxic effects of exposure to CHO have also been demonstrated by George *et al.* (2000); they noticed an increase of hepatocellular carcinoma cases and in the number of animals which developed tumors. According to the results of Ge *et al.* (2001), TCA and DCA are not only responsible of DNA hypomethylation and proliferation of peroxisomes, but also causing liver cancer. Finally, Green *et al.* (2003) reported that trichloroethanol (TCOH) causes an acidification of urine and increases urinary methylmalonic acid and plasma N-methyltetrahydrofolate in exposed rats to TCE. Several potential tumor target organs for TCE have been identified and significant differences have been reported between males and females, among species and among different strains of given species (Lash *et al.*, 2006). For some strains of male mice, liver and lungs have been designated as the principle affected organs while kidneys, Leydig cells and the hematopoietic system are the principle target organs in male rats. Epidemiology studies for humans identified several potential target organs including kidneys, liver, cervix and hematopoietic cells (i.e. non-Hodgkin's lymphoma) (Wartenberg *et al.*, 2000).

Three possible routes of absorption of trichloroethylene have been identified: dermal, oral and especially by inhalation. The absorbed dose of TCE by animals or humans quickly gets into the bloodstream and reaches target organs such as liver, kidneys and nervous system. Liver is the principle site of biotransformation of this chemical. TCE is predominantly metabolized by oxidation and the contribution of GSH-conjugation route is secondary (Figure 3.1) (Lash *et al.*, 2000a). In the first step of the oxidation route, TCE is metabolized into chloral hydrate (CHO) essentially by the action of CYP2E1 (Lipscomb *et al.*, 1997; Nakajima *et al.*, 1992a). Subsequently, the chloral hydrate is transformed either by oxidation to trichloroacetic acid (TCA) or by



**Figure 1.1** Metabolic pathways of trichloroethylene.

(Right pathway) CDH: chloral dehydrogenase (aldehyde oxidase); ADH: alcohol dehydrogenase; EHR: enterohepatic recirculation; FA: formic acid; GA: glyoxylic acid; TC-O-P450: oxygenated TCE-cytochrome P450 transition state; TCOG: TCOH glucuronide; UGT: uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase; TCE: trichloroethylene; TCA: trichloroacetic acid; OA: oxalic acid; MCA: monochloroacetic acid; CHL: chloral; TCOH: trichloroethanol; DCA: dichloroacetic acid; (left pathway) BL: cysteine conjugate 1-lyase; CGDP: cysteinyl-glycine dipeptidase; DCVG: dichlorovinyl glutathione; DCVSH: dichlorovinyl mercaptan; NADVC: N-acetyl dichlorovinylcysteine; GGTP:  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase; GST: glutathione S-transferase; DCVC: dichlorovinylcysteine; NAT N-acetyltransferase. Figure adapted from Clewell et al. (2000).

reduction to trichloroethanol (TCOH) which is a non-carcinogenic metabolite (Figure 3.1). The first pathway is catalyzed by alcohol dehydrogenase (Jadhav *et al.*, 2007) and the second by aldehyde oxidase (CDH) (Bonse *et al.*, 1975; Daniel, 1963; Ikeda *et al.*, 1980; Miller et Guengerich, 1983). Analyses also revealed the presence of other minor metabolites; mainly monoxide and dioxide of carbon in exhaled air and oxalic acid and a mixture of trichloroacetic acid, aminoethanol-N-hydroxyacetyl acids and mono and dichloroacetic (MCA and DCA) in urine (Birner *et al.*, 1993; Dekant, 1984; Dekant *et al.*, 1990; Dekant *et al.*, 1986a; Dekant *et al.*, 1986; Hathaway, 1980; Ogata et Saeki, 1974; Traylor *et al.*, 1977). The other route of biotransformation of TCE, taking place also in the liver, is the GSH conjugation. Catalyzed by glutathione S-transferase, a glutathione conjugate which is the S-(1, 2-dichlorovinyl) glutathione (DCVG) (GST) is formed. Then the DCVG is metabolised by the  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGTP) to free glutamic acid and cysteine conjugate form (Figure 3.1) (Dekant *et al.*, 1990).

According to the American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) (1992), the threshold limit value (TLV) for TCE is currently 50 ppm as an 8-hr time-weighted average (TWA) and the short-term exposure limit is 200 ppm. TLV value is based on central nervous system (CNS) effects (headaches, fatigue, irritability) and the short-term exposure limit purpose is to protect against its anesthetic effects (American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), 1992). These limit values for workplace are well above the recent EPA guidelines (US Environmental Protection Agency (EPA), 2001). According to this agency, concentrations up to 0.0051 mg/kg/day are considered non-carcinogenic but induce fetal cardiac malformations in Sprague-Dawley rats (Johnson *et al.*, 2003). The next concentration limit value given by EPA is 0.048 mg/kg/day and is responsible for decreased thymus weight in female B6C3F1 mice (Keil *et al.*, 2009). Finally, two carcinogenic concentration limits are reported in EPA guidelines;

0.18 ppm for renal carcinoma and liver cancer and 0.36 ppm for NHL (Raaschou-Nielsen *et al.*, 2003).

Additionally there is an ever-increasing consumption of drugs that may modulate this risk when co-exposure occurs. Indeed, pharmaceuticals, which are biologically active, may influence the metabolism of trichloroethylene in the liver and thus affect its pharmacokinetic and/or its pharmacodynamic and consequently its toxicity in the target tissue. Toxicokinetic interactions on TCE have recently been reported with aspirin and acetaminophen but no other related published research can be found for other drugs (Plewka *et al.*, 2000; Zielińska-Psujka *et al.*, 2001).

This research aims to identify drugs that can interfere with the metabolism of TCE (oxidative pathway only) and hence that have the potential to modulate the health risk related to TCE exposure. In order to achieve this goal, metabolic interactions between trichloroethylene and 14 widely used drugs have been studied *in vitro*. The selected drugs are: acetaminophen, salicylic acid, ibuprofen, mefenamic acid, naproxen, amoxicillin, erythromycin, diclofenac, valproic acid, carbamazepine, gliclazide, cimetidine, ranitidine, and sulfasalazine. Rat hepatocyte suspensions are used to identify potential interacting drugs and rat liver microsomes to characterize most potent drug-TCE interactions that have been identified.



## 1.2 Material and Methods

### 1.2.1 Chemicals and material

Cryopreserved rat hepatocytes from Sprague Dawley (pooled from 12 animals, M00005, Lot MRK) and microsomes (pooled from 12 animals, M00001, Lot DTT) were purchased from Celsis In Vitro Technologies (Baltimore, MD, USA) and ZenBio (Research Triangle, NC, USA). The cells were stored in liquid nitrogen until use. Amoxicillin (97.8 %), carbamazepine (> 99%), cimetidine (> 99%), ranitidine (> 99%), gliclazide (99.5 %), erythromycin (95.1 %), valproic acid (100 %), naproxen (98 %), sulfasalazine (98 %), ibuprofen (99.8 %), diclofenac (> 99%), acetaminophen (100 %), mefenamic acid (99.7 %), salicylic acid (99.9 %), William's medium E (WME), newborn calf serum (NCS), 2, 2, 2 Trichloroethanol (TCOH),  $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ( $\beta$ -NADP<sup>+</sup>), glucose-6-phosphate, glucose 6 phosphate deshydrogenase, magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>), Brij58 and uridine diphosphate glucuronic acid (UDPGA, 99.7 %) were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Trichloroethylene (TCE, ACS) came from VWR Chemical Suppliers-BDH (Radnor, PA, USA). Trichloroacetic acid (TCA, 99 %) and dichloroacetic acid (DCA) were purchased from Anachemia Science (Montreal, Qc., CANADA). Sulphuric acid (95 %–98 %) were supplied by Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Methanol (HPLC, 99.8 %) came from Caldon Biotech Inc. (Vista, CA, USA). Finally, Nanopure water was prepared in our laboratory using Nanopure Diamond System (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA).

### 1.2.2 Assessment of metabolic interactions in rat hepatocyte suspensions

Just before use, hepatocytes were thawed according to the supplier's instructions and

counted. Cell viability was determined by trypan-blue exclusion method. Hepatocytes were diluted to a concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml with WME medium and transferred to 20 ml gas chromatography (GC) vials in 0.145 ml aliquots. Suspensions were pre-incubated for 20 min with and without drugs dissolved in WME (10 % NCS) at concentrations 10 times higher than the therapeutically maximum concentrations observed in human blood (Table 1.1). TCE ( $0.01 \text{ mM} = 5 K_m$ ) was added in a small volume of incubation medium to each vial and the suspensions were incubated with TCE for 120 min at  $37^\circ\text{C}$  and agitated at 150 rpm. Incubations were initiated upon introduction of TCE. Controls (vials without drugs but TCE added) are considered at time  $t=0$ , i.e., when TCE is added to vials. After incubation, reactions were stopped by adding 350  $\mu\text{l}$  of esterifying solution ( $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{methanol}$ , 6:5:1) to enable volatilization of acetates. TCE concentration selection was based on Kadry et al, (1989) results. The selected concentration is lower than the threshold at which toxic effects were observed in hepatocytes. The durations of incubation are based on preliminary tests, in which the percentage of metabolites formed and the cell viability after incubation time were measured. Testing of cell viability showed no significant difference between controls and co-exposed (TCE and drugs) suspensions, ensuring that cell viability is not affected by the selected drug concentrations. After two hours of incubation, cells exposed to TCE alone and those co-exposed to drugs (acetaminophen, diclofenac, sulphasalazine) exhibited a cell viability of respectively  $27.4 \pm 3 \%$  and  $20 \pm 5 \%$ . Furthermore, a previous published study from our laboratory (Verner *et al.*, 2009) did not see any significant change in cell viability with drug concentrations that were 50 times higher.

Higher than therapeutic blood concentrations of drugs (10 times) have been used for easier and better identification of drugs that do interact with the metabolism of TCE, which is the main purpose of this *in vitro* part of our research project. Verner *et al.*



(2009) adopted a similar strategy i.e. using drug concentrations 50 times higher than the therapeutic blood concentrations for identification of interactions between the same drugs and n-nonylphenol and bisphenol A in rat hepatocytes. The results of Verner *et al.* (2009) showed no significant differences in cell viability of hepatocytes exposed to pollutants alone and co-exposed to concerned chemicals and drugs at  $50XC_{max}$ . In our experiments, drugs were dissolved in the same medium used for hepatocytes i.e. William's medium and TCE was dissolved in ethanol prior to addition to the incubation medium. Ethanol as dissolving medium for TCE was used, in exactly the same concentrations in exposed to drugs, as well as control samples. Ethanol represents less than 2% of the total reaction volume. Assuming biotransformation can possibly be significant at these experimental conditions, the effect will be similar, if not identical, for exposed and control samples. Moreover, published results of Kessova et Cederbaum (2003) and Lu et Cederbaum (2008) support that ethanol has a stabilization and induction effects on CYP2E1 conformation, but when exposure is chronic and/or accute; which obviously not the case for our testing conditions.

**Table 1.1** Maximum drug concentrations in human blood during exposure to therapeutic dosage and drug concentrations used in the screening part of this study with rat hepatocytes (Verner *et al.*, 2009)

Drugs	Treatment classes	Plasma $C_{\max}$ ( $\mu\text{M}$ )	Drug concentration in assays (mM)
Acetaminophen	Analgesic, antipyretic	100 <sup>a</sup>	1
Salicylic acid	Non-steroidal anti-inflammatory	490 <sup>b</sup>	4.9
Ibuprofen	Non-steroidal anti-inflammatory	50 <sup>c</sup>	0.5
Mefenamic acid	Non-steroidal anti-inflammatory	29 <sup>d</sup>	0.29
Naproxen	Non-steroidal anti-inflammatory	374 <sup>e</sup>	3.74
Diclofenac	Non-steroidal anti-inflammatory	5 <sup>f</sup>	0.05
Cimetidine	Anticonvulsive	12 <sup>g</sup>	0.12
Valproic acid	Anticonvulsive	481 <sup>h</sup>	4.81
Carbamazepine	Anticonvulsive	38 <sup>i</sup>	0.38
Gliclazide	Anti-diabetic	46 <sup>j</sup>	0.46
Ranitidine	H2 blocker	1 <sup>k</sup>	0.01
Sulphasalazine	Anti-inflammatory	14 <sup>l</sup>	0.14
Amoxicillin	Antibiotic	9 <sup>m</sup>	0.09

Erythromycin	Antibiotic	4 <sup>n</sup>	0.04
Notes: <sup>a</sup> (Rawlins <i>et al.</i> , 1977); <sup>b</sup> (Brantmark <i>et al.</i> , 1982); <sup>c</sup> (De Brabander <i>et al.</i> , 2000); <sup>d</sup> (Neuvonen <i>et al.</i> , 1988); <sup>e</sup> (Mroszczak <i>et al.</i> , 1988); <sup>f</sup> (Kirchheiner <i>et al.</i> , 2003); <sup>g</sup> (Grahnen <i>et al.</i> , 1979); <sup>h</sup> (Hussein <i>et al.</i> , 1994); <sup>i</sup> (Miller <i>et al.</i> , 1993); <sup>j</sup> (Davis <i>et al.</i> , 2000); <sup>k</sup> (Morichau-Beauchant <i>et al.</i> , 1986); <sup>l</sup> (Allgayer <i>et al.</i> , 1984); <sup>m</sup> (Bodey <i>et al.</i> , 1972); <sup>n</sup> (Thompson <i>et al.</i> , 1980).			

### 1.2.3 Confirmation and characterization of metabolic interactions

Two steps followed the identification of drug-TCE interactions in rat hepatocytes as described above: 1) the five drug-TCE interactions that were strongest were confirmed using rat liver microsomes (RLM) for either inhibition of TCOH glucuronidation if metabolite levels were greater than control or inhibition of TCE oxidation if metabolite levels were lower than control, and 2) those confirmed were then characterized to determine the type of inhibition and  $K_i$  values. In both TCE oxidation and TCOH glucuronidation reactions, RLM were suspended in 0.1 M phosphate buffer (pH=7.4) with a concentration of 2 mg/ml of protein using 145  $\mu$ l in 20 ml vials. For glucuronidation,  $MgCl_2$  (5 mM), (Brij58) (0.05 %) and UDPGA (5 mM) were added to the buffer. After 45 min of incubation, reaction was stopped by a thermal shock of 100 °C during 30 min. For oxidation, the buffer preparation contained 10 mM of glucose-6-phosphate, 2 units/ml of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 1 mM of  $NADP^+$  and 5 mM of  $MgCl_2$ . The oxidation reaction was incubated for 120 min and reaction was stopped by adding 350  $\mu$ l of esterifying solution. Preliminary tests showed that reaction rates were linear up to 45 min for glucuronoconjugation of TCOH acid and up to 120 min for hydroxylation of TCE in microsomal protein concentrations up to 2 mg/ml.

Before performing a full characterization, identified potent metabolic interactions were confirmed by incubating rat microsomes with drugs at same drug concentrations as used during incubations with hepatocytes (i.e.  $10XC_{max}$ ). To characterize the inhibition of TCE (or TCOH) metabolism by drugs (i.e. determine the type of inhibition and  $K_i$  values), metabolic inhibition tests were performed using 5 inhibitor concentrations of selected drugs and 3 substrate (i.e. TCOH or TCE) concentrations. Inhibitors were added to the medium as dissolved aliquots in the same phosphate buffer.

#### 1.2.4 Chemical analysis by GC-MS

TCE, TCOH and methyl-esterified TCA and DCA (m-TCA and m-DCA) were analysed by headspace gas chromatography coupled with mass spectrometry using an Agilent 5975C gas chromatograph linked to single quadrupole mass spectrometer (Agilent 7890A GC-MS) and a headspace autosampler (CTC CombiPal). Samples in vials were heated to 125 °C for 20 min before headspace injection into the GC-MS. The samples were injected in a HP-5MS column: (30 mX250 µmX0.25 µm) in a split mode (17:1). Helium (He) was used as mobile phase and injection was regulated to a rate of 1 ml/min. Temperature parameters for the column, injector and detector were respectively 135 °C, 200 °C and 230 °C. Finally, the retention times for TCE, m-DCA, TCOH and m-TCA were 2.81, 5.05, 5.34 and 5.68 min, respectively. Only trichloroethylene and its metabolites (TCA, TCOH and DCA) were followed for quantitative analyses.

#### 1.2.5 Data analysis and statistics

Concentrations of trichloroethylene and its metabolites (TCA and TCOH) in co-incubations with drugs were compared to those in control samples using standard T-Test. Statistical analyses were computed using the Sigma Stat module version 3.11 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).  $P < 0.05$  was chosen as level of significance. Enzyme kinetic constants were calculated by non-linear regression model using SigmaPlot Enzyme Kinetics module version 9.01 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

### 1.3 Results

#### 1.3.1 *In vitro* identification of metabolic interactions

*In vitro* experiments revealed that biotransformation of trichloroethylene is significantly affected only by some of the 14 selected drugs. Drugs can be segregated into four groups following the obtained screening results (Figure 1.2). Group 1 is composed of drugs causing no significant interactions. Drugs of groups 2 and 3 significantly affect both TCE metabolites, respectively by increasing and decreasing TCA and TCOH levels. For these drugs, TCA and TCOH levels were affected approximately in the same proportion. Finally, group 4 includes drugs significantly affecting only one metabolite either TCA or TCOH. Table 1.2 gives details about how each drug is affecting TCE biotransformation. TCA level modulations result mainly from the direct action of drugs and secondary from biotransformation of TCOH into TCA.

The effect of selected drugs on DCA levels was not assessed since the concentrations of this chemical, in exposed samples as well as in controls, were too low to be measured by GC-MS. Preliminary simulations of TCE metabolism modulation using a published PBPK model (Clewett et Andersen, 2004) indicated no significant effect on this metabolite level. We choose not to examine GSH pathway during this investigation. No significant changes in hepatocyte viability were noticed when co-incubated samples (30 %) were compared to drug-free control (25 %) incubations. The five chemicals showing the strongest interactions were: naproxen, salicylic acid, valproic acid, acetaminophen and gliclazide.

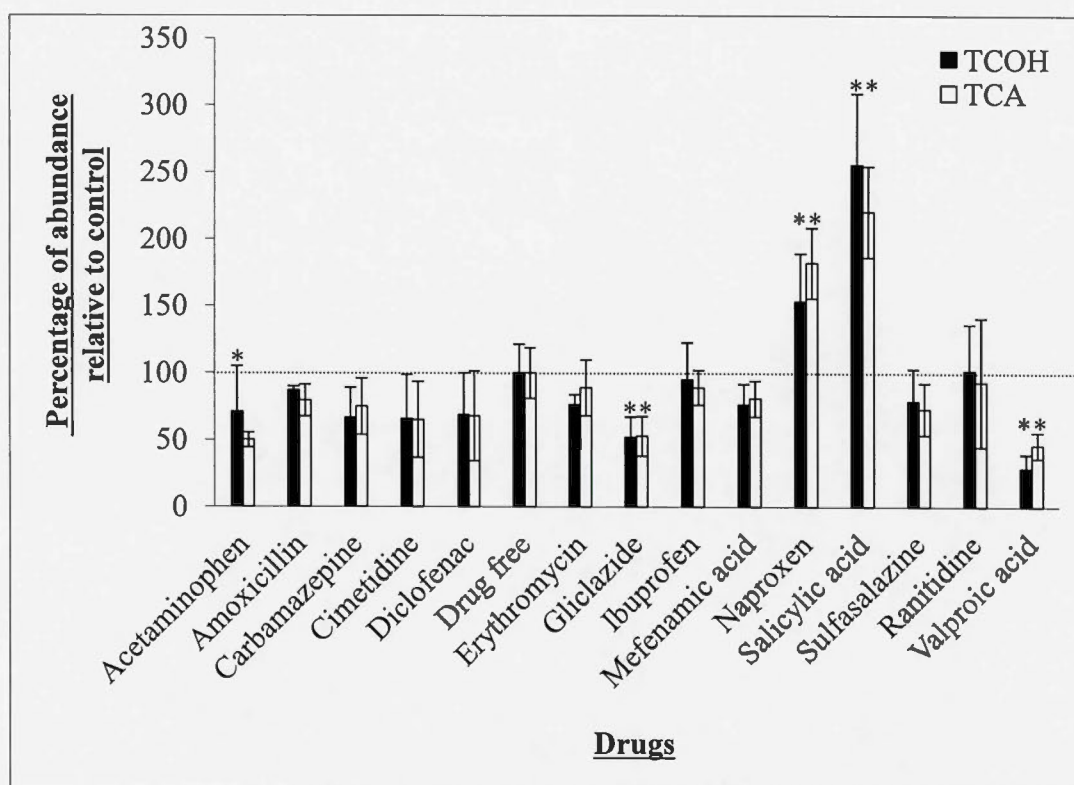
**Table 1.2** Interaction groups of selected drugs and their effect on TCE metabolism

Group	General effect	Drugs	Impact on TCA levels <sup>1</sup>		Impact on TCOH levels <sup>1</sup>	
			Fold change	T-test P value	Fold change	T-test P value
Group 1	No significant effect	Amoxicillin	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant
		Carbamazepine				
		Ibuprofen				
		Mefenamic acid				
		Ranitidine				
Group 2	Increase both TCA and TCOH levels	Naproxen	2 fold ↑	<0.001	1.5 fold ↑	0.001
		Salicylic acid	2.2 fold ↑	<0.001	2.5 fold ↑	0.001
Group 3	Decrease both TCA and TCOH levels	Acetaminophen	2 fold ↓	<0.001	0.3 fold ↓	0.005
		Cimetidine	0.25 fold ↓	0.014	0.25 fold ↓	0.016
		Diclofenac	0.3 fold ↓	0.011	0.3 fold ↓	0.016
		Gliclazide	2 fold ↓	<0.001	2 fold ↓	<0.001
		Valproic acid	2 fold ↓	<0.001	3 fold ↓	<0.001



Group	General effect	Drugs	Impact on TCA levels <sup>1</sup>		Impact on TCOH levels <sup>1</sup>	
			Fold change	T-test P value	Fold change	T-test P value
Group 4	Affect either TCA or TCOH levels	Erythromycin	0.25 fold ↓	0.006	Not significant	Not significant
		Sulphasalazine	0.3 fold ↓	0.008		

<sup>1</sup> n=5 for all exposure conditions.



**Figure 1.2** Modulation of trichloroethylene biotransformation by drugs in suspended rat hepatocytes exposed to TCE (n=5).

Samples were incubated with TCE (0.01  $\mu$ M) at 37 °C for 120 min and agitated at 150 rpm. Initial drug concentrations were equal to 10 times the maximum plasma concentrations following a therapeutic dose in humans (10XC<sub>max</sub>). Error bars represent the standard deviation (SD). \*\*:  $p \leq 0.001$  and \*:  $p < 0.05$  for both measured metabolites.

### 1.3.2 Confirmation and characterization of metabolic interactions in rat hepatic microsomes: trichloroethanol glucuronidation

Following the identification part of this study, our focus narrowed to the 5 drugs presenting the highest potential of metabolic interactions. The criteria for this selection are an increase or a decrease greater than 50 % in metabolite levels with a

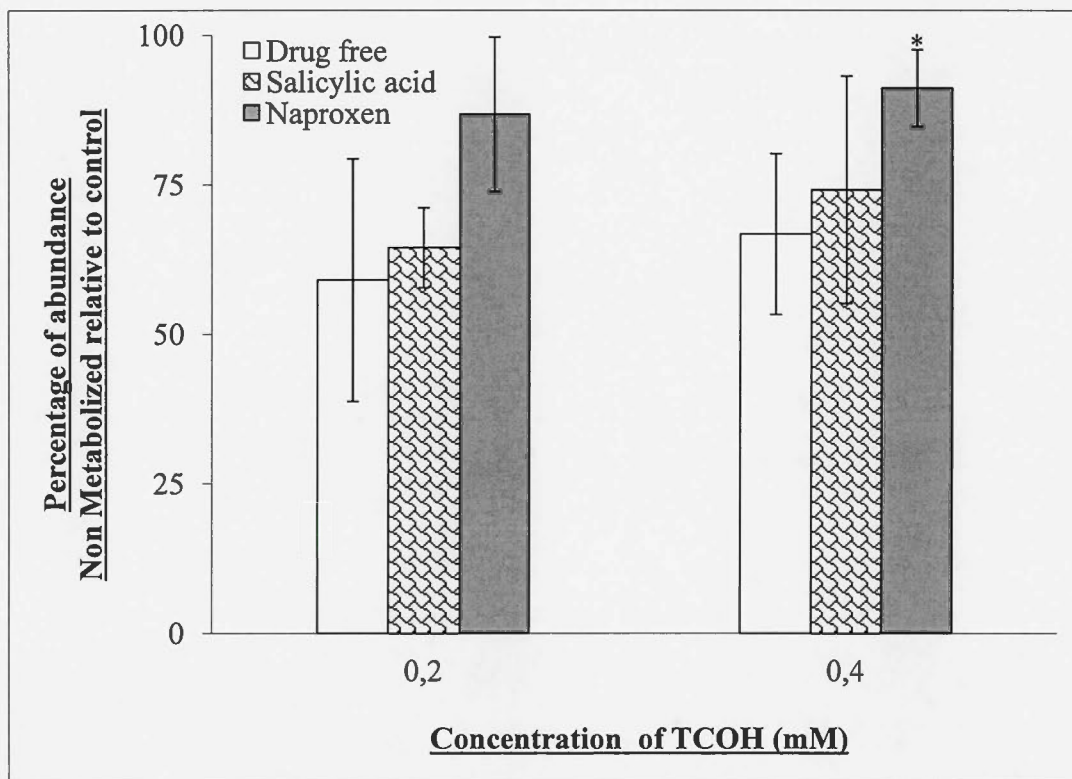
$p \leq 0.001$ . A single exception of this rule was for acetaminophen for which  $p \leq 0.005$  for TCOH because this compound was also reported to interact with TCE in another study (Plewka *et al.*, 2000). Confirmation and characterization of trichloroethanol glucuronidation using rat hepatic microsomes has been limited to drugs of group 2 i.e. naproxen and salicylic acid. Results show that naproxen inhibits glucuronidation of TCOH by acting directly on the enzyme responsible of this biotransformation (Figure 1.3). But in the case of salicylic acid, no inhibition was detected in microsomal co-incubations assays (Figure 1.3). Trichloroethanol glucuronidation was then characterized using permeated rat liver microsomes and biotransformation kinetic constants were determined by non-linear regression of metabolic velocity data (Figure 1.4). Simple one-substrate Michaelis-Menten kinetics is best described by equation (1.1) with  $R^2$  values above 0.99:

$$\text{Velocity} = \frac{V_{\max} \times C}{K_{\text{mapp}} + C} \quad (1.1)$$

where  $V_{\max}$  is the maximum enzymatic velocity,  $K_{\text{mapp}}$  is the apparent affinity constant and  $C$  is the substrate concentration of trichloroethanol.

TCE was glucuronidated in microsome suspensions with calculated values of  $K_{\text{mapp}}=0.7632 \text{ mM}$  and  $V_{\max}=0.01084 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .

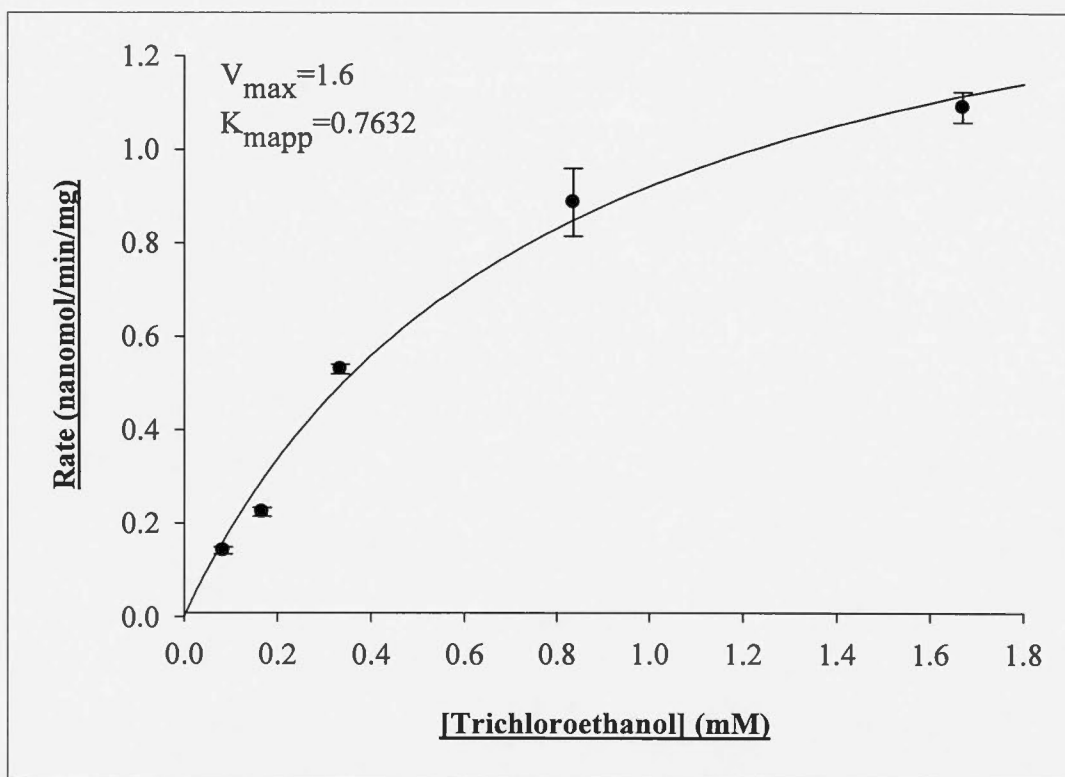
The inhibition of TCOH metabolism by naproxen was also characterized. Experiments with rat liver microsome suspensions were carried out to assess the



**Figure 1.3** Impact of drugs ( $10X_{C_{max}}$ ) on trichloroethanol metabolism in rat liver microsomes ( $n=5$ ) exposed to TCOH.

Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 45 min and agitated at 150 rpm. TCOH concentrations used were: 0.2 and 0.4 mM. Error bars represent the standard deviation (SD). \*:  $p < 0.05$ .

impact on trichloroethanol glucuronidation of co-exposure to naproxen. Concentration-dependent inhibition data of trichloroethanol metabolism with naproxen was recorded and analyzed using a non-linear regression model. The results revealed a partial competitive inhibition which can be described by equation (1.2):



**Figure 1.4** Michaelis–Menten kinetics for TCOH disappearance by glucuronidation in rat liver microsomes ( $n=3$ ).

Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 45 min and agitated at 150 rpm. Five substrate concentrations were used: 0.0835, 0.167, 0.334, 0.835, and 1.67 mM. Error bars represent the standard deviation (SD).

$$\text{Velocity} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_{mapp}}{C}\right) \times \left(\frac{1 + \frac{C_i}{K_{iapp}}}{1 + \frac{I}{\alpha K_{iapp}}}\right)} \quad (1.2)$$

where  $V_{\max}$  is the maximum enzymatic velocity,  $K_{\text{mapp}}$  is the apparent affinity constant,  $C_i$  is the inhibitor concentration,  $K_{\text{iapp}}$  is the apparent inhibition constant,  $C$  is the substrate concentration and  $\alpha$  is a constant.

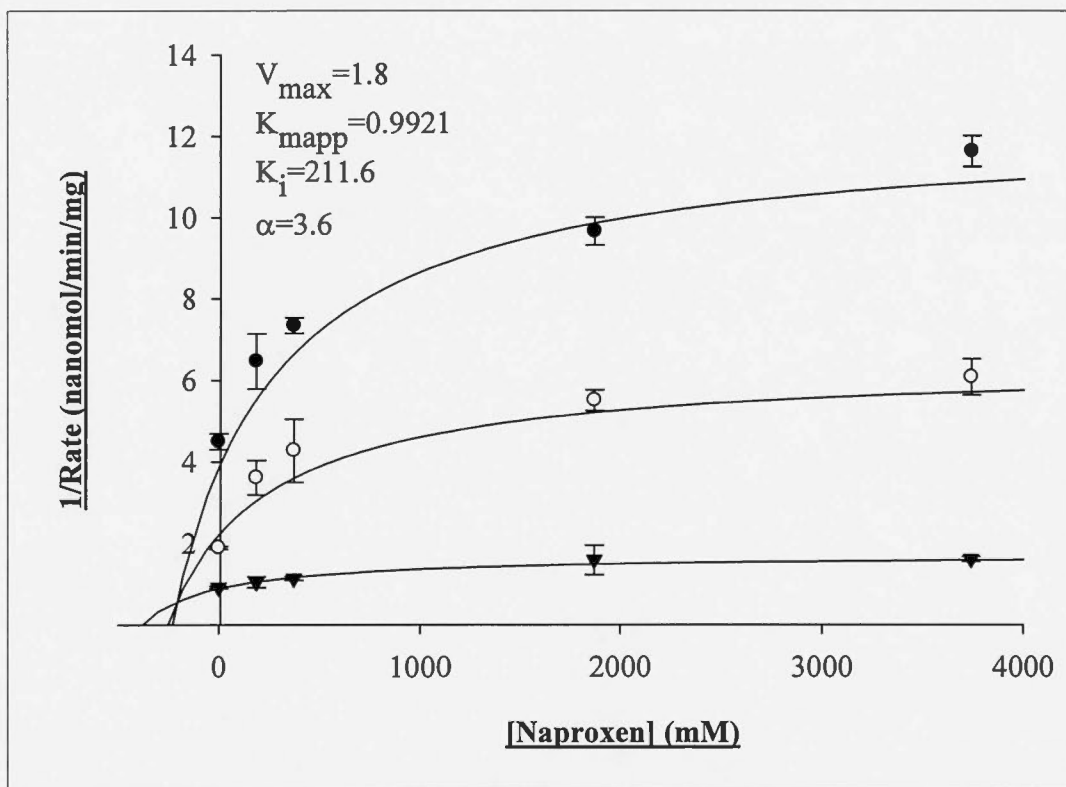
Glucuronidation was inhibited by naproxen with calculated values of  $K_{\text{iapp}}=211.6 \mu\text{M}$  and  $\alpha=3.6$ . The non-linear regression descriptive model of this partial competitive inhibition kinetics fitted experimental data with  $R^2 > 0.97$  (Figure 1.5).

### 1.3.3 Confirmation and characterization of metabolic interactions in rat hepatic microsomes: trichloroethylene oxidation

Confirmation and characterization of trichloroethylene oxidation were performed for group 3 drugs that demonstrated greater and significant interactions i.e. acetaminophen, gliclazide and valproic acid. Experimental results confirm the existence of an inhibition of the oxidation pathway of TCE. For valproic acid, this inhibition affects both metabolites i.e. TCA and TCOH, for gliclazide TCOH only, while for acetaminophen no effect was detected (Figure 1.6). Trichloroethylene oxidation was then characterized using rat liver microsomes. Metabolic constants were determined by non-linear regression of velocity data (Figures 1.7 and 1.8). Simple one-substrate Michaelis-Menten kinetics is best described by equation (3.1) with  $R^2$  values above 0.95 for TCOH and 0.98 for TCA.

Trichloroethylene was oxidized in microsomal suspensions with a  $K_{\text{mapp}}=8.85 \mu\text{M}$  for TCOH formation and  $K_{\text{mapp}}=4.49 \mu\text{M}$  for TCA formation. When correcting for partitioning to determine concentrations in incubation medium using (Poulin et Haddad, 2011), a log P of 2.42 and a Henry's constant of  $0.00985 \text{ Atm m}^3/\text{mole}$  at



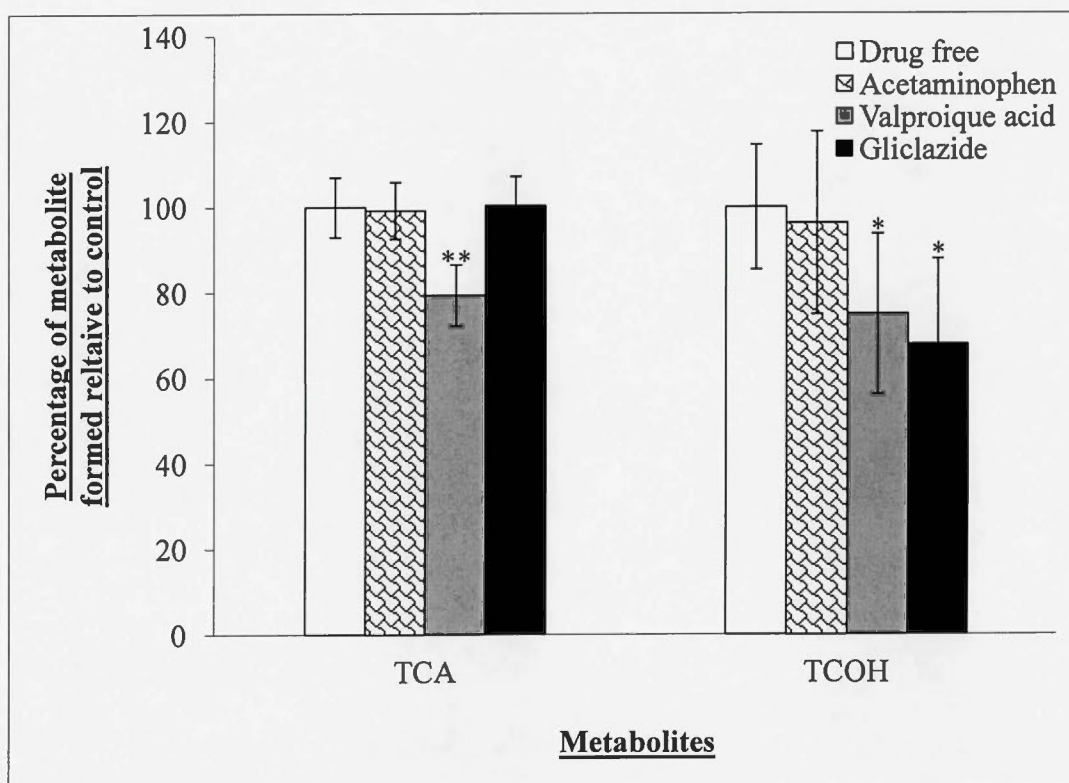


**Figure 1.5** Dixon plots for inhibition of TCOH glucuronidation by naproxen in rat liver microsomes ( $n=3$ ).

Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 45 min and agitated at 150 rpm. Three substrate [(●) 0.167, (○) 0.334 and (▼) 1.67 mM] and five inhibitor (0, 187, 374, 1870, and 3740  $\mu$ M) concentrations were used. Error bars represent the standard deviation (SD).

25 °C, the  $K_{mapp}$  in incubation medium ( $K_{mmedium}$ ) is equal to 20.9  $\mu$ M and 10.6  $\mu$ M for TCOH and TCA formation, respectively. The  $V_{max}$  values for TCOH and TCA formation are 0.2214 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> and 0.1117 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, respectively.

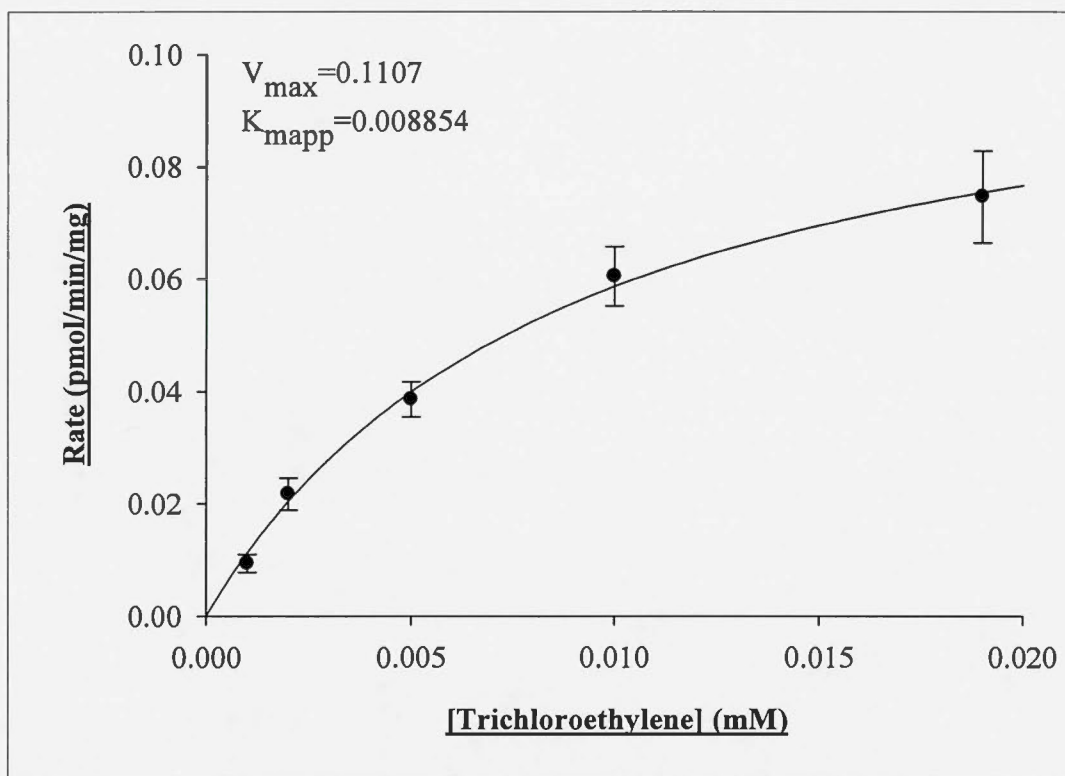




**Figure 1.6** Impact of drugs ( $10X C_{max}$ ) on TCOH and TCA appearance following oxidation in rat liver microsomes ( $n=5$ ) exposed to TCE (0.01 mM). Incubations were performed for 120 min at 37 °C and 150 rpm using a microsomal protein concentration of 2 mg/ml. Error bars represent the standard deviation (SD). \*:  $p < 0.05$ .

#### 1.3.4 Characterization of trichloroethylene metabolism inhibition by gliclazide

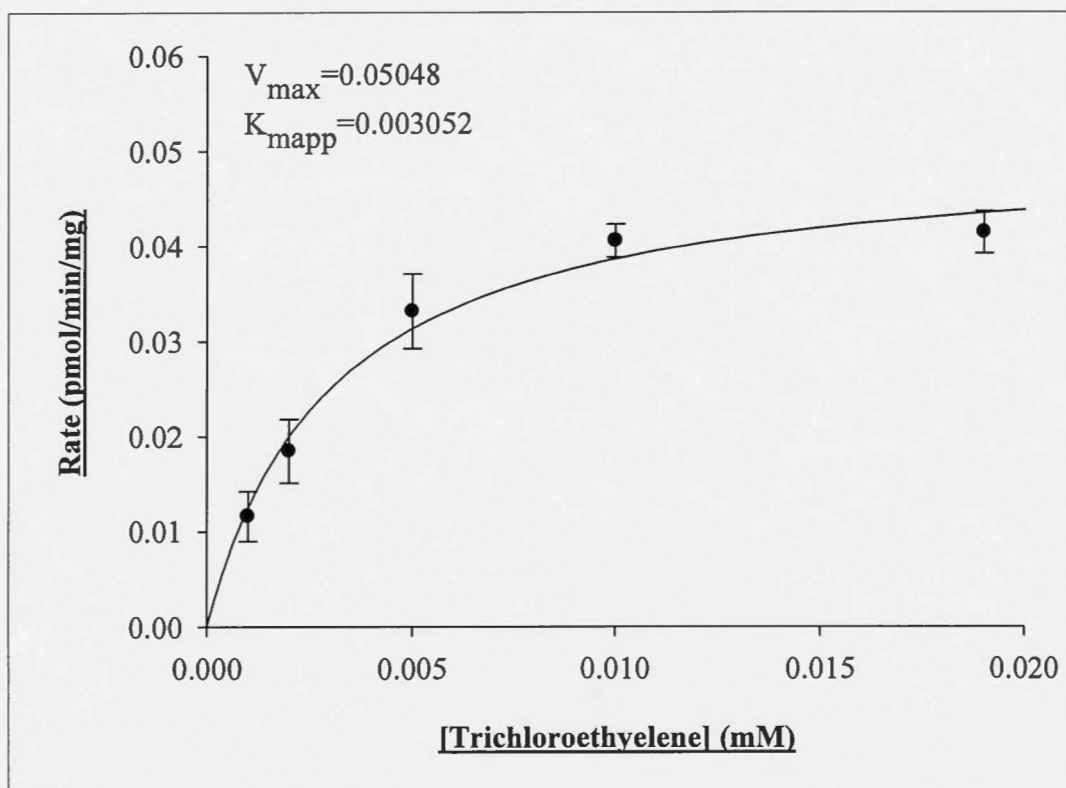
The inhibition of TCE oxidation by gliclazide, resulting in a decrease of TCOH, was characterized. Experiments with rat liver microsome suspensions were carried out to assess the impact of co-exposure to gliclazide on the oxidation of trichloroethylene. Concentration – dependent inhibition data of trichloroethylene metabolism with



**Figure 1.7** Michaelis–Menten kinetics for TCOH appearance following oxidation in rat liver microsomes ( $n=3$ ).

Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 120 min and agitated at 150 rpm. Substrate concentrations of 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, and 0.02 mM were used. Error bars represent the standard deviation (SD).

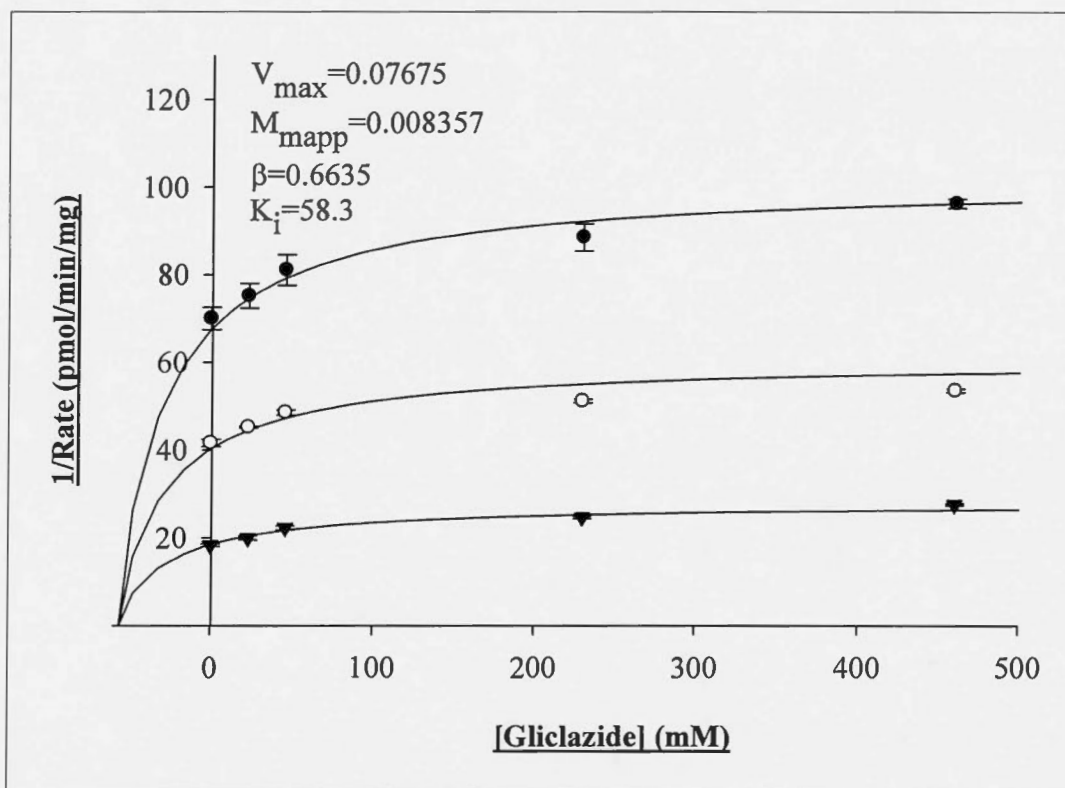
gliclazide was recorded and analyzed using a non-linear regression model (Dixon plots presented in Figure 1.9). The results indicate a partial non competitive inhibition, which can be described by equation (3.3):



**Figure 1.8** Michaelis-Menten kinetics for trichloroacetic acid (TCA) formation in rat liver microsomes (n=3).

Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 120 min and agitated at 150 rpm. Substrate concentrations of 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, and 0.02 mM were used. Error bars represent the standard deviation (SD). (N.B: concentrations based on amount of TCE injected in 20 ml vial).

$$\text{Velocity} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_{\text{mapp}}}{C}\right) \times \left(1 + \frac{C_i}{K_{\text{iapp}}}\right)} \times \frac{1}{\left(1 + C_i \times \frac{\beta}{K_{\text{iapp}}}\right)} \quad (1.3)$$



**Figure 1.9** Dixon plots for inhibition of trichloroethanol (TCOH) formation by gliclazide in rat liver microsomes ( $n=3$ ).

Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 120 min and agitated at 150 rpm. Three substrate [(●) 0.002, (○) 0.004, and (▼) 0.02 mM] and 5 inhibitor (0, 23, 46, 230, and 460  $\mu\text{M}$ ) concentrations were used. Error bars represent the standard deviation (SD).

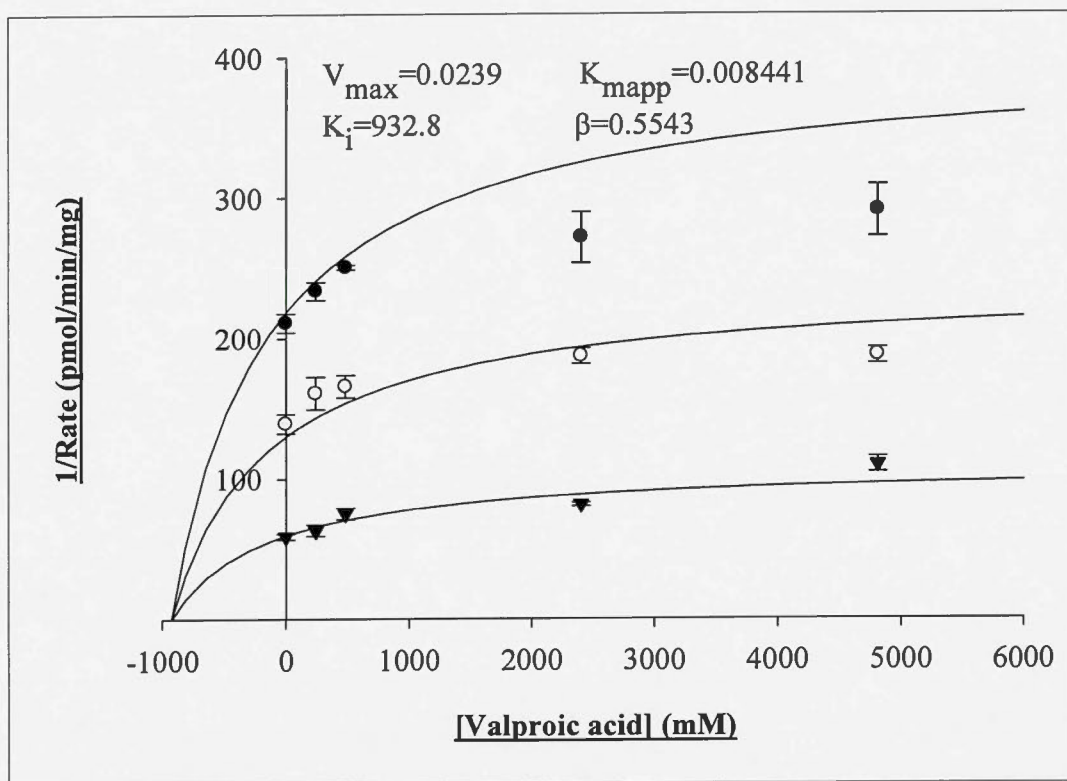
where  $V_{\max}$  is the maximum enzymatic velocity,  $K_{\text{mapp}}$  is the apparent affinity constant,  $C_i$  is the inhibitor concentration,  $K_{\text{iapp}}$  is the apparent inhibition constant,  $C$  is the substrate concentration and  $\beta$  is a constant.

Trichloroethanol formation was inhibited by gliclazide with estimated values of  $K_{\text{iapp}}=58 \mu\text{M}$  and  $\beta=0.66$ . The non-linear regression descriptive model of this partial non competitive inhibition kinetics fitted experimental data with  $R^2 > 0.99$ .

### 1.3.5 Characterization of trichloroethylene metabolism inhibition by valproic acid

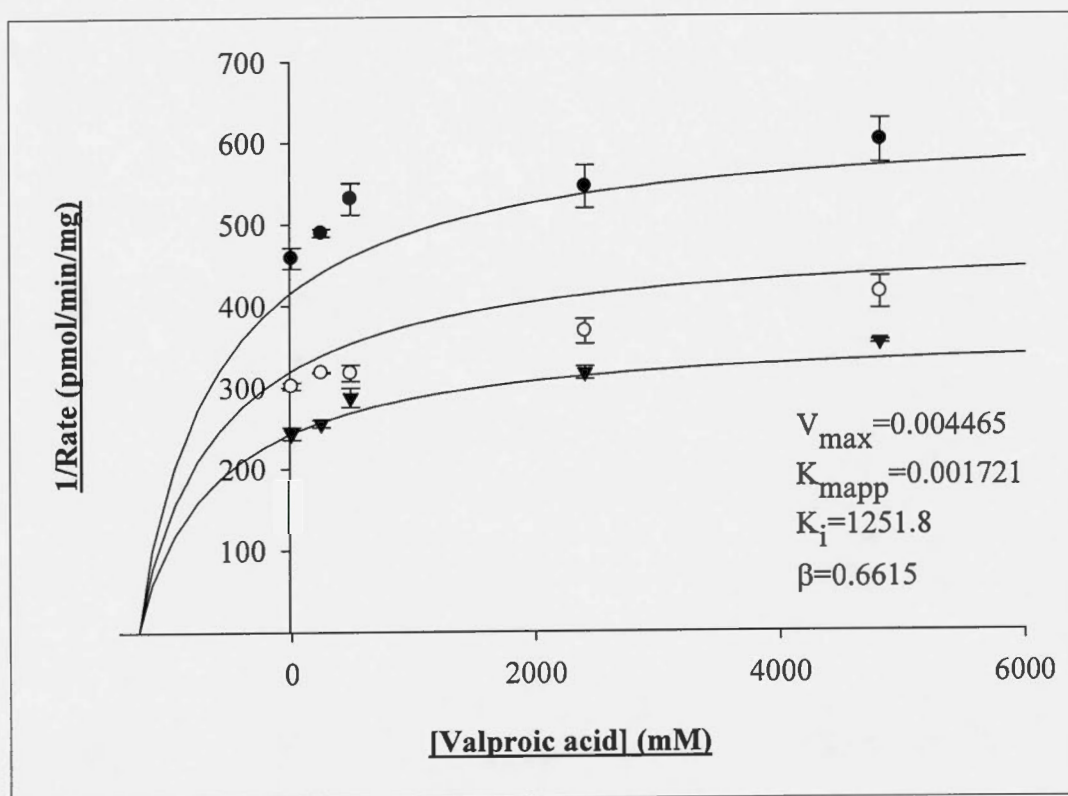
The inhibition of TCE metabolism by valproic acid, resulting in a decrease of TCOH, was also characterized. Experiments with rat liver microsome suspensions were carried out to assess the impact of co-exposure to valproic acid on the oxidation of trichloroethylene. Concentration-dependent inhibition data of trichloroethylene metabolism with valproic acid as well as the formation of trichloroethanol and trichloroacetic acid was recorded and analyzed using a non-linear regression model (Dixon plots presented in Figures 1.10 and 1.11). The results indicate a partial non competitive inhibition, which can be described by equation (1.3). The formation of trichloroethanol was inhibited by valproic acid with estimated values of  $K_{iapp}=932.8 \mu\text{M}$  and  $\beta=0.5543$ . The formation of trichloroacetic acid was inhibited by valproic acid with estimated  $K_{iapp}=1251.8 \mu\text{M}$  and  $\beta=0.6615$ . The non-linear regression descriptive model of this partial non competitive inhibition kinetics fitted experimental data with  $R^2 > 0.99$ .





**Figure 1.10** Dixon plots for inhibition of trichloroethanol (TCOH) formation by valproic acid in rat liver microsomes ( $n=3$ ).

Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 120 min and agitated at 150 rpm. Three substrate [(●) 0.002, (○) 0.004, and (▼) 0.02 mM] and 5 inhibitor (0, 240.5, 481, 2405, and 4810  $\mu\text{M}$ ) concentrations were used. Error bars represent the standard deviation (SD).



**Figure 1.11** Dixon plots for inhibition of trichloroacetic acid (TCA) formation rate by valproic acid in rat liver microsomes ( $n=3$ ). Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 120 min and agitated at 150 rpm. Three substrate [(●) 0.002, (○) 0.004, and (▼) 0.02 mM] and 5 inhibitor (0, 240.5, 481, 2405, and 4810  $\mu$ M) concentrations were used. Error bars represent the standard deviation (SD).



## 1.4 Discussion

Fourteen widely consumed drugs, belonging to a wide spectrum of therapeutic classes, have been selected for this research aiming to explore co-exposure to drug-pollutant modulation effect on trichloroethylene metabolism (i.e. oxidative pathway). Evidence of such metabolic interactions exists for TCE in the literature, but only for very few drugs. Our *in vitro* results from incubations in rat hepatocyte suspensions segregated the selected drugs into 4 groups (Table 1.2). Drugs of group 1 (amoxicillin, carbamazepine, ibuprofen, mefenamic acid, and ranitidine) showed no effect on TCE metabolism. The obvious explanation would be the distinct metabolic pathways used by TCE and the drugs of this group. Although also metabolized mainly through oxidation, the P450 enzymes involved for these 5 drugs are different from those for TCE. For these drugs biotransformation, the involved enzymes are: CYP2C9, CYP2C8 and CYP2C19 for ibuprofen (De Oliveira *et al.*, 2005; Hamman *et al.*, 1997); CYP2D6, CYP2C9 and CYP2C19 for amoxicillin (Drawz et Bonomo, 2010; Grant, 2005); CYP3A4 for carbamazepine (Kerr *et al.*, 1994); CYP2C9 for mefenamic acid (Bonnabry *et al.*, 1996) and CYP2C19, CYP2D6 and CYP1A2 for ranitidine (Chung *et al.*, 2000).

Drugs of group 4 (erythromycin and sulphasalazine) affect either TCA or TCOH levels, but the increase or decrease observed is clearly less pronounced than what was measured with group 2 (naproxen and salicylic acid) and 3 (acetaminophen, glyclazide, valproic acid, cimetidine, and diclofenac). For these 3 last groups of drugs, cytotoxicity is an unlikely source of observed interactions as mentioned earlier and furthermore interactions were also observed with subcellular fractions.

We intentionally choose to narrow our focus to drugs of these groups 2 and 3 after the exploratory part of this research. The second part is dedicated to the confirmation and characterization of the strongest interactions using rat microsomes.

The metabolic interactions with salicylic acid and acetaminophen reported in rat hepatocyte suspensions were not observable when using rat microsomal assays. Plausible explanation for salicylic acid could be that the observed increase with hepatocytes may result from an inhibition of glucuronidation by one of the drug's metabolites, or by a disruption of the UDPGA homeostasis. But neither of these two phenomena can be observed during microsomal assays. Similar results have been reported by Verner *et al.* (2009) when they explored metabolic interactions between salicylic acid and *n*-nonylphenol and bisphenol A. They reported a high level of interaction between salicylic acid and *n*-nonylphenol and bisphenol A in hepatocyte suspensions, but none of these interactions was observed with microsomes. Verner *et al.* (2009) explained the differences of results observed with hepatocytes and microsomes by the presence of mechanisms other than direct enzyme inhibition by the parent product, such as an inhibition by one of the drug's metabolites, disruption of carriers or disturbance of homeostasis of UDPGA. Another plausible explanation for the increase of metabolite levels in hepatocytes (i.e. TCA and TCOH) in the presence of salicylic acid may be an induction of CYP450. Zielińska-Psuja *et al.* (1999) reported such an induction during an *in vivo* treatment by this drug. This was also observed by Damme *et al.* (1996) and Favari *et al.* (1997), confirming that acetylsalicylic acid can act as an inducer of CYP450. Further investigations are still needed to elucidate the mechanism of the observed inhibition in hepatocytes. CYP450 induction *in vitro* resulting from a short-term exposure (2 hrs) to salicylic acid is unlikely, but cannot be definitely discarded. For acetaminophen, the decrease of TCOH and TCA levels noticed with rat hepatocytes was also not observed in microsomal incubations. According to the literature acetaminophen is known to be a

CYP450 inducer, but this effect occurs only after at least two hours of exposure to the drug (Plewka *et al.*, 2000). In our case, the cells were exposed to acetaminophen for 20 min during pre-incubation and 2 hours during co-exposure. There is little difference in time and furthermore the observable goes against what would be expected (i.e. an increase in metabolite levels). Perhaps an acetaminophen metabolite formed in hepatocytes and not in microsomes would result in TCE oxidation inhibition or glucuronidation induction by this metabolite. This suggests that this drug does not significantly directly inhibit CYP450 2E1 in its unchanged form in the concentrations and conditions used in this study. Further investigations are still needed to elucidate the mechanism of the observed inhibition in hepatocytes.

Naproxen, valproic acid and gliclazide are the drugs that presented metabolic interactions *in vitro* and which were positively confirmed using microsomes. Increased levels of metabolites, i.e. TCA and TCOH, induced by naproxen can be explained by an inhibition of the enzyme responsible of glucuronidation since it is the main route of biotransformation of this drug by isoform UGT2B7. This hypothesis is supported by the validation with rat microsomes and is consistent with the results of Verner *et al.* (2009). Their results demonstrate that n-nonylphenol and bisphenol A biotransformations are competitively inhibited by naproxen. Decreased levels of TCE metabolites (i.e. TCOH and TCA) caused by valproic acid and gliclazide may be explained by inhibition of CYP450 as demonstrated in microsomal assays. The valproic acid is an antiepileptic drug that is metabolized by several enzymes of the CYP450 family such as CYP1A1/2, CYP1B1 and CYP2E1. These three enzymes are directly involved in the metabolism of trichloroethylene (Kiang *et al.*, 2006). As for gliclazide, this drug is suggested to be metabolized primarily by CYP450 isoforms CYP2C9 and CYP2C19 (Park *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007) although this has not been yet confirmed experimentally. This wouldn't explain the interaction observed

with TCE. Perhaps gliclazide has a certain affinity to CYP2E1 without actually being a substrate.

The strongest inhibitions observed with rat hepatocytes and confirmed with microsomal assays were further characterized by performing enzyme kinetics in microsomes and data were analyzed using the SigmaPlot software. The three concerned drugs are naproxen, valproic acid and gliclazide. The calculated values of the inhibition constants for naproxen and gliclazide were respectively 211.6  $\mu\text{M}$  and 58.3  $\mu\text{M}$ . These values are close to the maximum human blood concentrations which can vary from 305 to 473  $\mu\text{M}$  for naproxen (Mroszczak *et al.*, 1988) and from 46 to 58.7  $\mu\text{M}$  for gliclazide (Davis *et al.*, 2000). These results are very important in the risk assessment of trichloroethylene exposure. But, further investigations are needed to adequately evaluate whether chronic use of naproxen and gliclazide can significantly reduce the metabolism of the pollutant in the liver and intestinal tissues and thus lead to higher internal exposure.  $K_{iapp}$  values determined from co-incubation assays with valproic acid were more than an order of magnitude greater than the maximum concentration in human blood published in the literature. This indicates that a significant metabolic interaction at the therapeutic level is unlikely to occur if human  $K_i$  are of similar values.

## 1.5 Conclusion

The present study demonstrates that some drugs have the potential to interfere with the metabolism of TCE at the level of oxidation or glucuronidation. These drugs are naproxen, valproic acid and gliclazide. They are often taken on a chronic basis and could alter the internal doses of TCE and/or metabolites and therefore may alter the risk associated to TCE exposure in medicated population. Current efforts are being deployed to determine the human *in vivo* significance.

## 1.6 Acknowledgments

This study was supported by a Discovery Grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

## CHAPITRE II

### *IN VITRO* METABOLIC INTERACTIONS BETWEEN DRUGS AND TRICHLOROETHYLENE IN HUMANS

Mouna Cheikh Rouhou<sup>a</sup> and Sami Haddad<sup>b</sup>

<sup>a</sup> TOXEN, Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal,  
C.P. 8888 Succ. Centre-ville, Montreal, (Qc.), Canada, H3C 3P8

<sup>b</sup> Département de Santé Environnementale et Santé au Travail, IRSPUM, Faculté de  
Médecine, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montreal, (Qc.),  
Canada, H3C 3J7

Soumis pour publication dans *Toxicology in Vitro*

Mouna Cheikh Rouhou : approche expérimentale, réalisation des expériences et  
rédaction de l'article.

Sami Haddad : approche expérimentale, correction et révision de l'article.



## Abstract

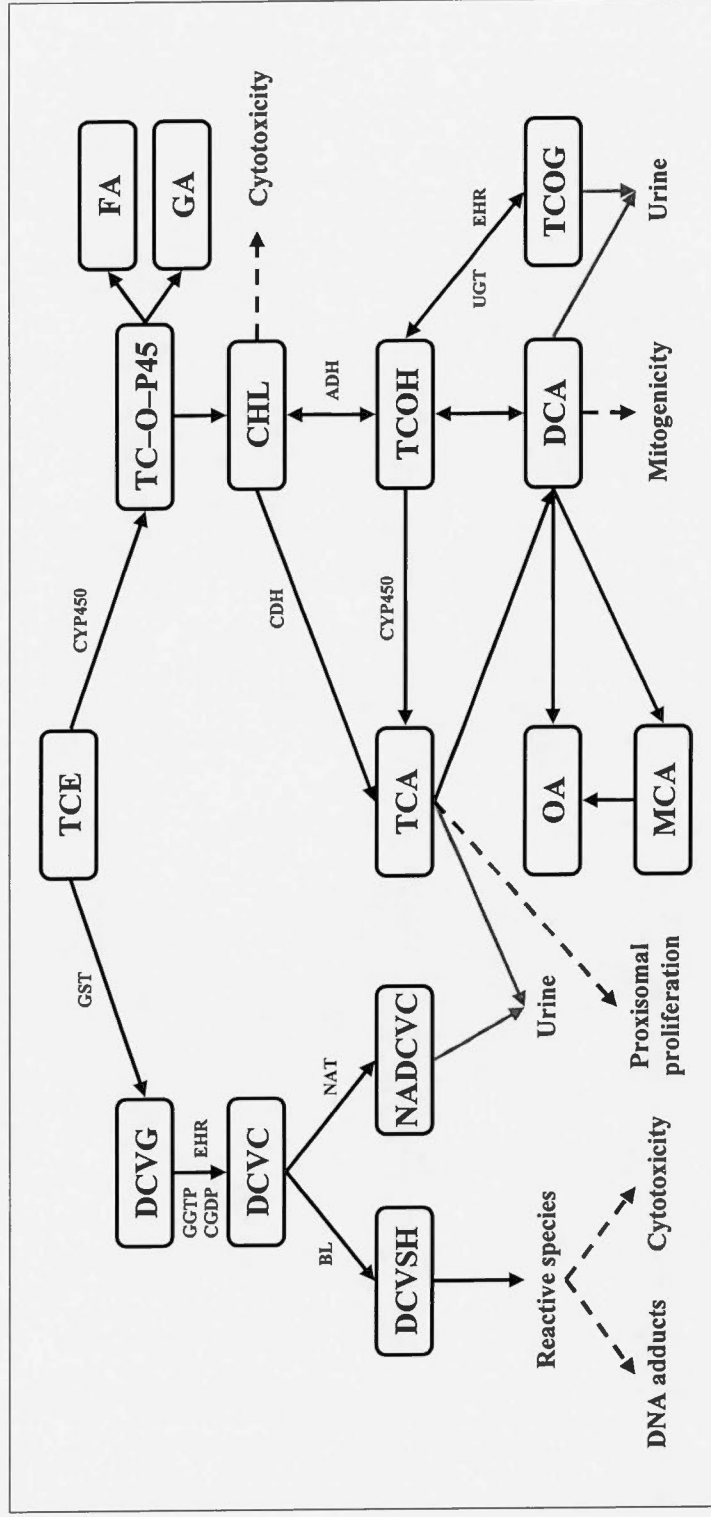
Toxicological interactions with drugs have the potential to modulate the toxicity of trichloroethylene (TCE). Our objective is to identify metabolic interactions between TCE and 14 widely used drugs in human suspended hepatocytes and characterize the strongest using microsomal assays. Changes in concentrations of TCE and its metabolites were measured by headspace GC-MS. Results with hepatocytes show that amoxicillin, cimetidine, ibuprofen, mefenamic acid, and ranitidine caused no significant interactions. Naproxen and salicylic acid were shown to increase both TCE metabolite levels, whereas acetaminophen, carbamazepine, and erythromycin rather decreased them. Finally, diclofenac, glimepiride, sulphasalazine, and valproic acid had an impact on the levels of only one metabolite. Among the 14 tested drugs, 5 presented the most potent interactions and were selected for confirmation with microsomes, namely naproxen, salicylic acid, acetaminophen, carbamazepine, and valproic acid. Characterization in human microsomes confirmed interaction with naproxen by competitively inhibiting trichloroethanol (TCOH) glucuronidation ( $K_i=2.329$  mM). Inhibition of TCOH formation was also confirmed for carbamazepine (partial non competitive with  $K_i=70$   $\mu$ M). Interactions with human microsomes were not observed with salicylic acid and acetaminophen, similar to prior results in rat material. For valproic acid, interactions with microsomes were observed in rat but not in human. Inhibition patterns were shown to be similar in human and rat hepatocytes, but some differences in mechanisms were noted in microsomal material between species. Next research efforts will focus on determining the adequacy between *in vitro* observations and the *in vivo* situation.

Key words: Trichloroethylene, drugs, interactions, human, rat, inhibition.

## 2.1 Introduction

Humans are frequently exposed to trichloroethylene (TCE). This widely used chemical has a large spectrum of applications in a variety of industries. According to the National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH), 3.5 million workers are exposed each year to TCE (Wu et Schaum, 2000). Furthermore, TCE pollution also represents a serious environment hazard, since recycling and disposal of this chemical is problematic; about 60 % of the world annual production is released in the atmosphere and in the oceans according to the US Environmental Protection Agency (EPA) (1997).

TCE is essentially biotransformed in the liver by oxidation and conjugation of GSH-conjugation pathway is secondary (Lash *et al.*, 2000a) (Figure 2.1). In the oxidation route, TCE is first metabolized into chloral hydrate (CHO), principally by the action of CYP 2E1 (Lipscomb *et al.*, 1997; Nakajima *et al.*, 1992a). CHO is thereafter biotransformed either by oxidation to trichloroacetic acid (TCA), or by reduction to a non-carcinogenic metabolite: the trichloroethanol (TCOH). Alcohol dehydrogenase (ADH) is the catalyzer for CHO oxidation to TCA and aldehyde oxidase (CDH) for the reduction CHO to TCOH (Bonse *et al.*, 1975; Daniel, 1963; Ikeda *et al.*, 1980; Miller et Guengerich, 1983). TCE main pathway of biotransformation also generates some other minor metabolites; mainly carbon monoxide and dioxide excreted in exhaled air; and oxalic acid, a mixture of TCA, aminoethanol-N-hydroxyacetyl acids, mono- and dichloroacetic (MCA and DCA) excreted in urine (Birner *et al.*, 1993; Dekant, 1984; Dekant *et al.*, 1990; Dekant *et al.*, 1986a; Dekant *et al.*, 1986; Hathaway, 1980; Ogata *et al.*, 1974; Traylor *et al.*, 1977). Liver is also the site of the secondary route of biotransformation of TCE i.e. GSH conjugation. In this pathway, a glutathione conjugate which is the S-(1, 2-dichlorovinyl) glutathione (DCVG) (Li *et al.*, 1999) is formed under the catalytic action of glutathione S-transferase. Catalyzed



**Figure 2.1** Metabolic pathways of trichloroethylene.

(Right pathway) CDH: chloral dehydrogenase (aldehyde oxidase); ADH: alcohol dehydrogenase; EHR: enterohepatic recirculation; FA: formic acid; GA: glyoxalic acid; TCE-O-P450: oxygenated TCE-cytochrome P450 transition state; TCOG: TCOH glucuronide; UGT: uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase; TCE: trichloroethylene; TCA: trichloroacetic acid; OA: oxalic acid; MCA: monochloroacetic acid; CHL: chloral; TCOH: trichloroethanol; DCA: dichloroacetic acid; (left pathway) BL: cysteine conjugate 1-lyase; CGDP: cysteinyl-glycine dipeptidase; DCVG: dichlorovinyl glutathione; DCVSH: dichlorovinyl mercaptan; NADCVS: N-acetyl dichlorovinylcysteine; GGTP:  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase; GST: glutathione S-transferase; DCVC: dichlorovinylcysteine; NAT N-acetyltransferase. Figure adapted from Clewell et al. (2000).

by the  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGTP), DCVG is then biotransformed to free glutamic acid and cysteine conjugate form (Figure 2.1) (Dekant *et al.*, 1990).

Several factors have been proven to affect the metabolism and toxicokinetic of trichloroethylene and consequently its toxicity. Species, sex, smoking, alcohol consumption and co-exposure to other substances (such as drugs and chemicals) are among these factors. (Elsenhans *et al.*, 1991; Gonzalez et Nebert, 1990; Kalow, 1962, 1992). An increase of harmful effects of TCE was observed when exposure to trichloroethylene is combined with some other environmental pollutants. Results of Dobrev *et al.* (2001) investigation show that exposure to trichloroethylene in combination with tetrachlorethylene and trichloroethane causes a 15% increase in blood concentrations of TCE, compared to that resulting from exposure to this substance alone. Ikeda (1974) found that toluene interferes in trichloroethylene metabolism by causing a non-competitive inhibition of biotransformation enzymes. Co-exposure to pharmaceutical drugs, which may induce similar metabolic interactions, has however been overlooked as a potential source of variability in chemical risk assessment.

Nowadays, many people are medicated with one or several drugs and sometimes for long periods of time. Medicinal drug consumption has been increasing steadily in many countries for several years now. This increase has been reported for the general population and for older people, especially with the better life expectancy recorded in different parts of the world. According to the IMS Health (2008), the world drug consumption spending was up by 5 % in 2006 compared to 2005; increasing from 370,015 million US \$ to 388,281 million US \$. In the U.S.A., drug expenditures in 1998 increased by 10.2 % (Mehl et Santell, 1999). In Canada, the use of patented drugs increased by 14.8 % in 1995 compared to 1994. In the same period the number of prescriptions was up by 3.7 % (Barat *et al.*, 2000). In England, Germany, and

Australia, the amounts for the most frequently used drugs are in the order of hundreds of tons per year (Huschek *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2002; Khan et Ongerth, 2004). The 2001 annual consumption of ibuprofen, acetaminophen, and diclofenac in Germany was respectively 334.89, 622, and 86 tons (Huschek *et al.*, 2004). While in England, it was respectively 162.79, 390 and 26.12 tons in 2000 (Jones *et al.*, 2002).

Drugs may interfere with TCE metabolism by competing or interacting for the same enzymes (metabolic pathways are shown in Cheikh Rouhou *et al.* (2012)), inducing their activity or even by depleting the reservoir of cofactors. TCE metabolic interactions have also been reported in the literature, but for very few drugs. Recent published research shows that acetaminophen consumption combined with TCE exposure increases the rate of P450, while aspirin stimulates mainly CYP450 enzymes and decreases the excretion of metabolites of trichloroethylene (TCOH and TCA) (Zielińska-Psuja *et al.*, 2001; Zielińska-Psuja *et al.*, 1999). We recently published a paper (Cheikh Rouhou *et al.*, 2012) where *in vitro* metabolic interactions between trichloroethylene and 14 different drugs were explored using rat material. Our *in vitro* results show that co-exposure to some drugs (naproxen, salicylic acid, acetaminophen, gliclazide, valproic acid, cimetidine, and diclofenac) had a significant impact (increase or decrease) on metabolite levels i.e. TCA and TCOH in hepatocyte suspensions. While some other drugs (erythromycin and sulphasalazine) significantly affect the levels of only one metabolite either TCA or TCOH. Naproxen, salicylic acid, valproic acid, acetaminophen and gliclazide were the drugs that showed the strongest metabolic interactions. Characterization of these interactions in rat liver microsomes showed that these drugs either inhibit the P450 oxidation of TCE (valproic acid and gliclazide: partial noncompetitive) or the glucuronidation of the TCOH (naproxen: partial competitive).

TCE and drugs co-exposure may induce a modulation of trichloroethylene metabolite concentrations. TCE is classified as carcinogenic substance, however, associated harmful effects are caused mainly by its metabolites (TCA inducing liver cancer, CHO lung cancer, DCA, liver tumors and DCVG, nephrotoxicity) (Bull, 2000; Ge *et al.*, 2001; George *et al.*, 2000; Lash *et al.*, 2001). Thus, modulation of metabolite concentrations resulting from TCE-drug interactions may significantly alter toxicity risk associated with exposure to TCE.

For adequate human TCE exposure risk assessment and management, metabolic interactions between TCE and potential interfering drugs need to be explored and evaluated. Thus, this study aims to identify drugs that can interfere with TCE metabolism in humans and, hence, that have the potential to modulate the health risk related to trichloroethylene exposure. For this purpose, metabolic interactions between trichloroethylene and 14 widely used drugs have been explored in human *in vitro* material (i.e., human hepatocytes and liver microsomes). The selected drugs are: acetaminophen, salicylic acid, ibuprofen, mefenamic acid, naproxen, amoxicillin, erythromycin, diclofenac, valproic acid, carbamazepine, gliclazide, cimetidine, ranitidine, and sulphasalazine. Human hepatocyte suspensions were used to identify potential interacting drugs and human liver microsomes to characterize the most potent drug-TCE interactions. In human *in vitro* conclusions are compared to our previous published in rat *in vitro* results.



## 2.2 Material and Methods

### 2.2.1 Chemicals and material

Cryopreserved human hepatocytes (three donors, lots: KKO, ITL, and UFT) and microsomes (pooled from 50 donors, lot: WKO) were purchased from Celsis In Vitro Technologies (Baltimore, MD, USA) and ZenBio (Research Triangle, NC, USA). The cells were stored in liquid nitrogen until use. Amoxicillin (97.8 %), carbamazepine (> 99 %), cimetidine (> 99 %), ranitidine (> 99 %), gliclazide (99.5 %), erythromycine (95.1 %), valproic acid (100 %), naproxen (98 %), sulphasalazine (98 %), ibuprofen (99.8 %), diclofenac (> 99 %), acetaminophen (100 %), mefenamic acid (99.7 %), salicylic acid (99.9 %), William's medium E (WME), newborn calf serum (NCS), 2, 2, 2 Trichloroethanol (TCOH),  $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ( $\beta$ -NADP<sup>+</sup>), glucose-6-phosphate, glucose 6 phosphate deshydrogenase, magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>), Brij58 and uridine diphosphate glucuronic acid (UDPGA, 99.7 %) were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Trichloroethylene (TCE, ACS) came from VWR Chemical Suppliers-BDH (Radnor, PA, USA). Trichloroacetic acid (TCA, 99 %) and dichloroacetic acid (DCA) were purchased from Anachemia Science (Montreal, Qc., CANADA). Sulphuric acid (95 %–98 %) were supplied by Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Methanol (HPLC, 99.8 %) came from Caldon Biotech Inc. (Vista, CA, USA). Finally, Nanopure water was prepared in our laboratory using Nanopure Diamond System (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA).

### 2.2.2 Assessment of metabolic interactions in human hepatocyte suspensions

This method is described in detail in Cheikh Rouhou *et al.* (2012) with rat hepatocytes instead of human hepatocytes used here. Hepatocytes originated from male donors aged 49 to 75 years. The group of 5 donors were composed of smokers and non-smokers. Prior to use, hepatocytes were thawed and counted. The trypan-blue exclusion method was used to determine cell viability. A dilution of  $2 \times 10^6$  hepatocytes/milliliter (ml) in WME medium was transferred to 20 ml gas chromatography (GC) vials in 0.145 ml aliquots. A 20 min pre-incubation was performed with and without drugs dissolved in WME (10 % NCS) at concentrations 10 times higher than the therapeutical maximum blood concentrations ( $C_{\max}$ ) (Table 2.1). Incubations were initiated upon introduction of trichloroethylene by adding a small volume of medium containing TCE (0.01 millimolar (mM)) in each vial. Incubation was also initiated at time (t)=0 for vials containing no drugs (controls) i.e. when TCE is added. Ethanol was used as dissolving medium as described in Cheikh Rouhou *et al.* (2012). Interference of ethanol biotransformation with any potential drug-TCE interaction should not be a concern as demonstrated in this same reference.

The suspensions were incubated for 120 min at 37 degrees Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ) and agitated at 150 revolutions per minute (rpm). Reactions were stopped by adding 350 microliter ( $\mu\text{l}$ ) of esterifying solution ( $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{methanol}$ , 6:5:1) to enable volatilization of acetates. As described in the method, cell viability was checked to make sure it was not affected by the presence of drugs in the used range of concentration.

### 2.2.3 Confirmation of metabolic interactions

Assays were performed to determine whether the five strongest drug–TCE interactions could be observed using human liver microsomes (HLM) by testing either i) inhibition of TCOH glucuronidation if metabolite levels were greater than control, or ii) inhibition of TCE oxidation if metabolite levels were lower. In both TCE oxidation and glucuronidation reactions, HLM were suspended in 0.1 molar (M) phosphate buffer (pH=7.4) with a concentration of 2 milligram/ml (mg/ml) using 145  $\mu$ l in 20 ml vials. For this assay, drug concentrations were the same as those used during incubations with hepatocytes (i.e.,  $10XC_{max}$ ). For glucuronidation,  $MgCl_2$  (5 mM), (Brij58) (0.05 %) and UDPGA (5 mM) were added to the buffer. After 45 min of incubation, reaction was stopped by a thermal shock of 100 °C during 30 min. Preliminary tests showed that reaction rates were linear up to 45 min in microsomal protein concentrations up to 2 mg/ml.

For oxidation, the buffer preparation contained 10 mM of glucose–6–phosphate, 2 units/ml of glucose 6 phosphate dehydrogenase, 1 mM of  $NADP^+$  and 5 mM of  $MgCl_2$ . The oxidation reaction was incubated for 120 min and reaction was stopped by adding 350  $\mu$ l of esterifying solution. Preliminary tests showed that reaction rates were linear up to 120 min in microsomal protein concentrations up to 2 mg/ml.

### 2.2.4 Characterization of metabolic interactions

TCE–drug interactions that were confirmed in HLM were further characterized to determine the type of inhibition and inhibition constant ( $K_i$ ) values. To characterize the inhibition of drug–TCE (or TCOH), the incubations were performed following the

**Table 2.1** Maximum drug concentrations in human blood and drug concentrations used in the screening part of this study using human hepatocytes (Verner *et al.*, 2009)

Drugs	Treatment classes	Plasma $C_{\max}$ ( $\mu\text{M}$ )	Drug concentration in assays (mM)
Acetaminophen	Analgesic, antipyretic	100 <sup>a</sup>	1
Salicylic acid	Non-steroidal anti-inflammatory	490 <sup>b</sup>	4.9
Ibuprofen	Non-steroidal anti-inflammatory	50 <sup>c</sup>	0.5
Mefenamic acid	Non-steroidal anti-inflammatory	29 <sup>d</sup>	0.29
Naproxen	Non-steroidal anti-inflammatory	374 <sup>e</sup>	3.74
Diclofenac	Non-steroidal anti-inflammatory	5 <sup>f</sup>	0.05
Cimetidine	Anticonvulsive	12 <sup>g</sup>	0.12
Valproic acid	Anticonvulsive	481 <sup>h</sup>	4.81
Carbamazepine	Anticonvulsive	38 <sup>i</sup>	0.38
Gliclazide	Anti-diabetic	46 <sup>j</sup>	0.46
Ranitidine	H2 blocker	1 <sup>k</sup>	0.01
Sulfasalazine	Anti-inflammatory	14 <sup>l</sup>	0.14
Amoxicillin	Antibiotic	9 <sup>m</sup>	0.09

Erythromycin	Antibiotic	4 <sup>n</sup>	0.04
Notes: <sup>a</sup> (Rawlins <i>et al.</i> , 1977); <sup>b</sup> (Brantmark <i>et al.</i> , 1982); <sup>c</sup> (De Brabander <i>et al.</i> , 2000); <sup>d</sup> (Neuvonen et Kivisto, 1988); <sup>e</sup> (Mroszczak <i>et al.</i> , 1988); <sup>f</sup> (Kirchheiner <i>et al.</i> , 2003); <sup>g</sup> (Grahnen <i>et al.</i> , 1979); <sup>h</sup> (Hussein <i>et al.</i> , 1994); <sup>i</sup> (Miller et Ludden, 1993); <sup>j</sup> (Davis <i>et al.</i> , 2000); <sup>k</sup> (Morichau-Beauchant <i>et al.</i> , 1986); <sup>l</sup> (Allgayer <i>et al.</i> , 1984); <sup>m</sup> (Bodey et Nance, 1972); <sup>n</sup> (Thompson <i>et al.</i> , 1980).			

same protocol as in the confirmation assays, with the difference that multiple inhibitor and substrate concentrations were used (i.e., 5 concentrations for drugs and 3 for TCOH or TCE). Inhibitors were added to the medium as dissolved aliquots in the same phosphate buffer.

#### 2.2.5 Chemical analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS)

The same analytical method was used as in Cheikh Rouhou *et al.* (2012). Briefly, analysis of TCE, TCOH, methyl-esterified TCA and methyl-esterified DCA (m-TCA and m-DCA, respectively) was performed using headspace gas chromatography (Agilent gas chromatograph 5975C and CTC CombiPal autosampler) coupled with mass spectrometry (i.e., single quadrupole mass spectrometer) (Agilent 7890A GC-MS). Sample vials were heated to 125 °C for 20 min. The headspace of samples were then injected in a HP-5MS column: (30 meter (m)X250 micrometer (μm)X0.25 μm) in a split mode (17:1). Helium (He) was used as mobile phase and injection was regulated to a rate of 1 ml/min. The column, injector and detector temperatures were respectively 135 °C, 200 °C, and 230 °C. Finally, the retention times for TCE, m-DCA, TCOH, and m-TCA were 2.81, 5.05, 5.34, and 5.68 min, respectively.

#### 2.2.6 Data analysis and statistics

Concentrations of TCE, TCA, and TCOH in co-incubations with drugs were compared to those in control samples using standard T-Test. Statistical analyses were computed using the Sigma Stat module version 3.11 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).  $P < 0.05$  was chosen as level of significance. Enzyme kinetic constants



were calculated by non-linear regression model using SigmaPlot Enzyme Kinetics module version 9.01 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

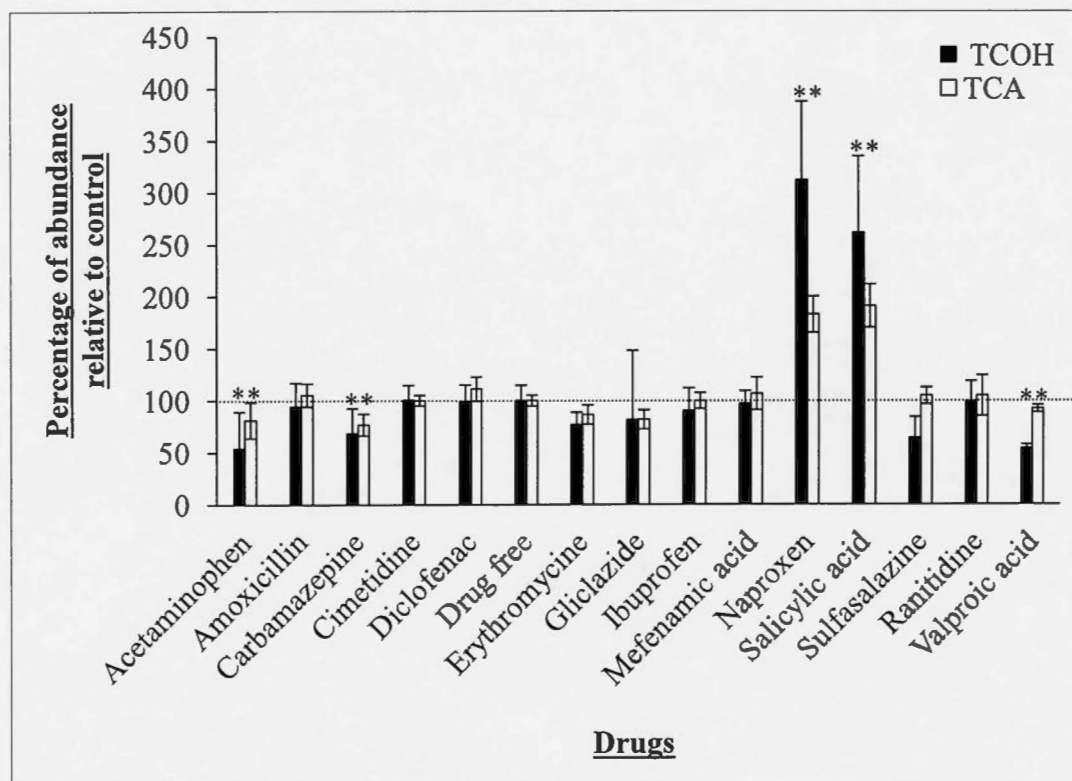
## 2.3 Results

### 2.3.1 *In vitro* identification of metabolic interactions

Incubations in human hepatocytes co-exposed to TCE in combination with selected drugs have been compared to controls, i.e. cells exposed to TCE only. Results show that biotransformation of trichloroethylene is significantly affected by the presence of 5 of the 14 tested drugs (Figure 2.2). Our experiments show (see Table 2.2) that 5 drugs do not cause any significant interactions (group 1: amoxicillin, cimetidine, ibuprofen, mefenamic acid and ranitidine). 2 drugs increase both TCA and TCOH levels (group 2: naproxen and salicylic acid). 3 drugs decrease levels of these metabolites (group 3: acetaminophen, carbamazepine and erythromycin). Finally 4 drugs affect the levels of only one metabolite (group 4: diclofenac, gliclazide, sulfasalazine and valproic acid). DCA was not detected in any sample. The five drugs showing the strongest interactions are: naproxen, salicylic acid (group 2), acetaminophen, carbamazepine (group 3) and valproic acid (group 4).

### 2.3.2 Confirmation and characterization of metabolic interactions in human hepatic microsomes: TCOH glucuronidation

After screening for interactions in human hepatocytes, we then focussed our attention to the 5 drugs presenting the highest potential of metabolic interactions. The hypothesis that interaction by group 2 drugs (naproxen and salicylic acid) affects TCOH glucuronidation was first tested. Results show that naproxen inhibits glucuronidation of TCOH by acting directly on the enzyme responsible of this



**Figure 2.2** Modulation of trichloroethylene biotransformation by drugs in suspended human hepatocytes exposed to TCE (n=5). Samples were incubated with TCE (0.01  $\mu$ M) at 37 °C for 120 min and agitated at 150 rpm. Initial drug concentrations were equal to 10 times the maximum plasma concentrations following a therapeutic dose in humans (10XC<sub>max</sub>). Error bars represent the standard deviation (SD). \*\*:  $p \leq 0.001$  and \*:  $p < 0.05$  for both measured.

biotransformation (Figure 2.3). But in the case of salicylic acid, no inhibition was detected in microsomal co-incubations assays (Figure 2.3).

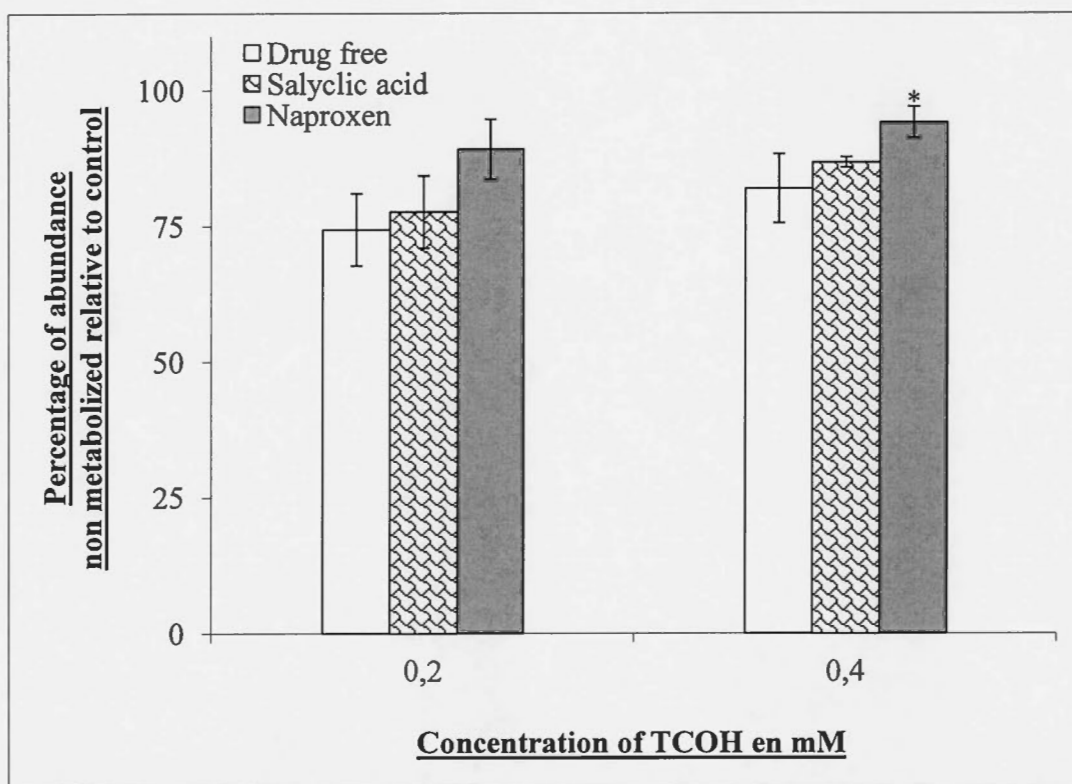
TCOH glucuronidation was then characterized using permeated human liver microsomes and biotransformation kinetic constants were determined by non-linear regression of metabolic velocity data (Figure 2.4). Simple one-substrate Michaelis-Menten kinetics is best described by equation (2.1) with  $R^2$  values above 0.97. TCE

**Table 2.2** Interaction groups of selected drugs and their effect on TCE metabolism

Group	General effect	Drugs	Impact on TCA levels <sup>1</sup>		Impact on TCOH levels <sup>1</sup>	
			Fold change	T-test P value	Fold change	T-test P value
Group 1	No significant effect	Amoxicillin	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant
		Cimetidine				
		Ibuprofen				
		Mefenamic acid				
		Ranitidine				
Group 2	Increase both TCA and TCOH levels	Naproxen	2 fold ↑	0.003	3 fold ↑	0.003
		Salicylic acid	2 fold ↑	0.003	2.5 fold ↑	≤0.001
Group 3	Decrease both TCA and TCOH levels	Acetaminophen	0.2 fold ↓	0.006	2 fold ↓	0.003
		Carbamazepine	0.3 fold ↓	0.021	0.3 fold ↓	0.008
		Erythromycin	0.2 fold ↓	0.021	0.15 fold ↓	0.03

Group	General effect	Drugs	Impact on TCA levels <sup>1</sup>		Impact on TCOH levels <sup>1</sup>	
			Fold change	T-test P value	Fold change	T-test P value
Group 4	Affect either TCA or TCOH levels	Diclofenac	0.15 fold ↑	0.044	Not significant	Not significant
		Gliclazide	Not significant	Not significant	0.2 fold ↓	0.008
		Sulphasalazine			0.4 fold ↓	0.007
		Valproic acid			2 fold ↓	0.001

<sup>1</sup> n=5 for all exposure conditions.



**Figure 2.3** Impact of drugs ( $10X C_{max}$ ) on TCOH metabolism in human liver microsomes (n=5).

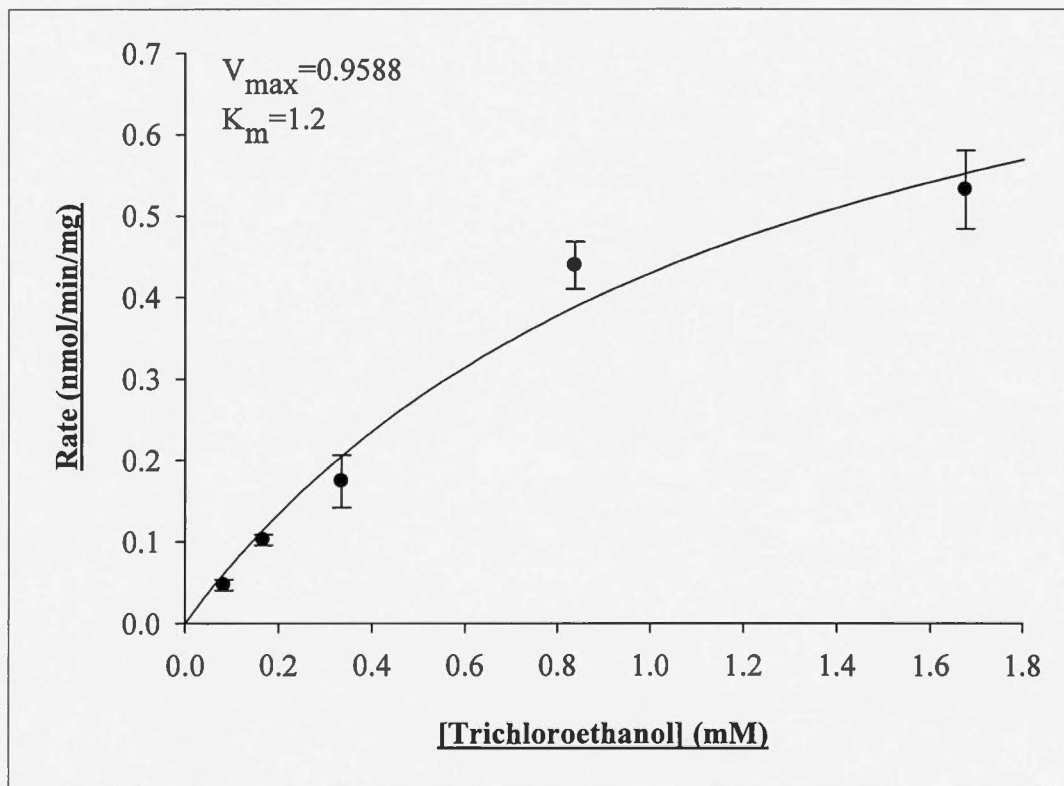
TCOH concentrations used were 0.2 mM and 0.4 mM. Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 45 min and agitated at 150 rpm. Error bars represent the standard deviation (SD). \*:  $p < 0.05$ .

was glucuronidated in microsome suspensions with an apparent affinity constant ( $K_{mapp}$ ) of 1.2 mM and a maximal metabolic rate ( $V_{max}$ ) of 0.9588 nanomolar (nM)  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ .

$$\text{Velocity} = \frac{V_{\max} \times C}{K_{mapp} + C}$$

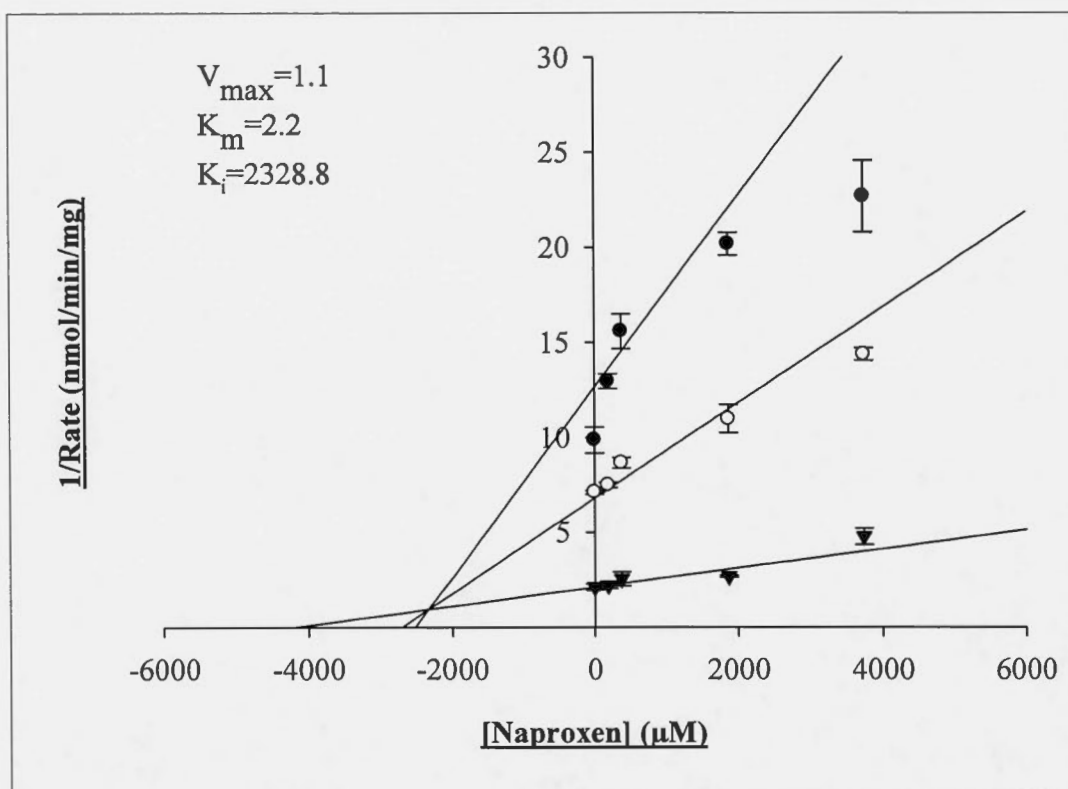
(2.1)





**Figure 2.4** Michaelis–Menten kinetics for TCOH disappearance by glucuronidation in human liver microsomes ( $n=3$ ). Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 45 min and agitated at 150 rpm. Five substrate concentrations were used: 0.0835, 0.167, 0.334, 0.835, and 1.67 mM. Error bars represent the standard deviation (SD).

The inhibition of TCOH metabolism by naproxen was also characterized. Concentration–dependent inhibition data of TCOH metabolism with naproxen was obtained and regression analyses were performed (Figure 2.5). The results revealed a competitive inhibition. The apparent inhibition constant ( $K_{iapp}$ ) is evaluated to be 2.329 mM ( $R^2 > 0.97$ ). Although, the data of the 0.167 mM of TCOH do not seem linear as the regression, among all the different descriptions of interaction tested, competitive inhibition best described the observed data.



**Figure 2.5** Dixon plots for inhibition of TCOH glucuronidation by naproxen in human liver microsomes (n=3).

Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 45 min and agitated at 150 rpm. Three substrate [0.167 mM (●), 0.334 mM (○), and 1.67 mM (▼)] and five inhibitor concentrations (0, 187, 374, 1870, and 3740 μM) were used. Error bars represent the standard deviation (SD).

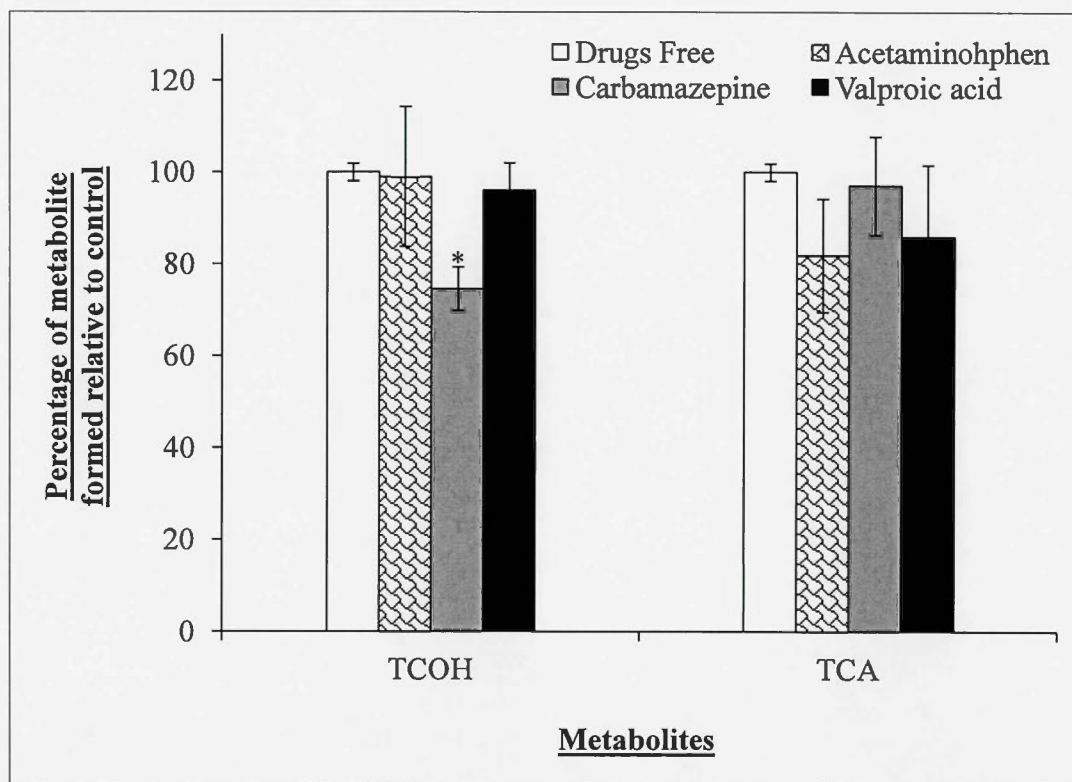
### 2.3.3 Confirmation and characterization of metabolic interaction in human hepatic microsomes: TCE oxidation

The hypothesis that interactions by drugs that decrease TCOH and/or TCA levels inhibit TCE oxidation was tested with acetaminophen, carbamazepine, and valproic acid, which showed pronounced interaction and  $p < 0.001$ . Experimental results confirm significant inhibition of the oxidation pathway of TCE for carbamazepine

only and strictly for TCOH formation (Figure 2.6). Lower levels of TCA induced by co-administration of acetaminophen were observed, but this effect is not statistically significant.

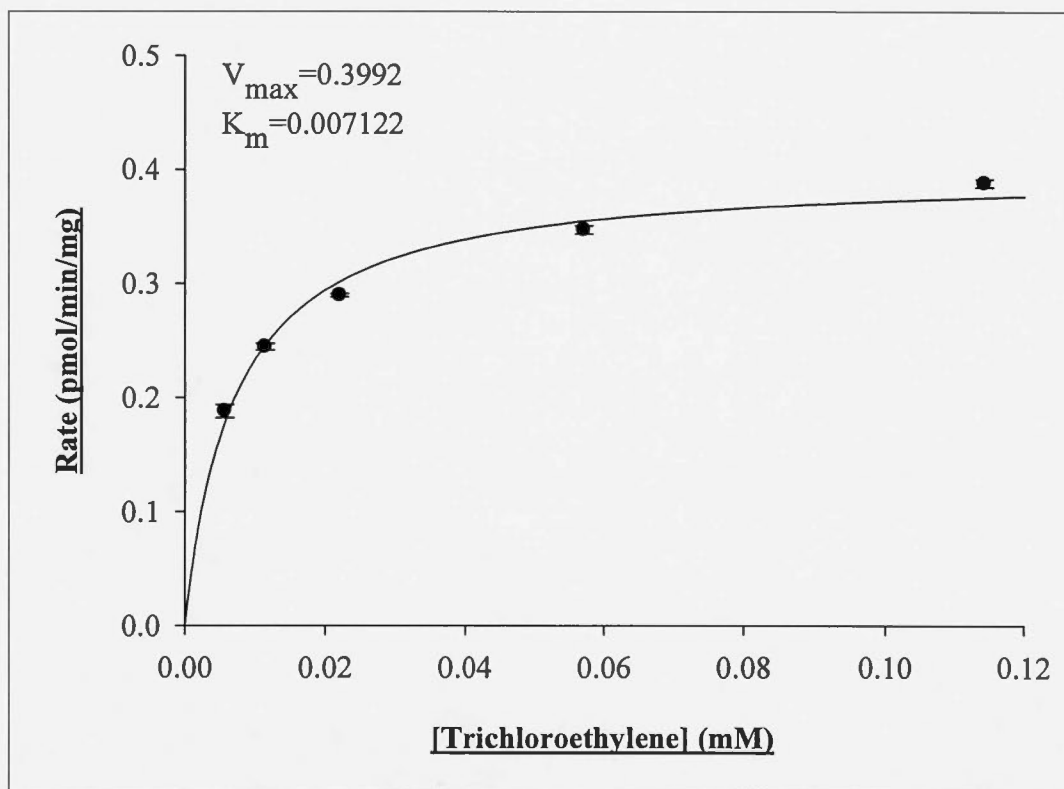
TCE oxidation was then characterized using permeated human liver microsomes. Metabolic constants were determined by non-linear regression of velocity data (Figure 2.7). Simple one-substrate Michaelis-Menten kinetics equation (2.1) best describes the kinetic data with  $R^2$  values above 0.99 for TCOH formation. TCE was oxidized in microsomal suspensions with a  $K_{mapp}=7.1\ \mu\text{M}$  for TCOH and  $V_{max}=0.399$  picomolar (pmol)  $\text{min}^{-1}\ \text{mg}^{-1}$ . When correcting for partitioning to determine concentrations in incubation medium (using Poulin et Haddad (2011), a  $\log^{\circ}\text{P}$  of 2.42 and a Henry's constant of 0.00985 atmosphere (Atm)  $\text{m}^3/\text{mole}$  at 25 °C), the  $K_{mapp}$  in incubation medium ( $K_{mmedium}$ ) is equal to 16.7  $\mu\text{M}$  for TCOH formation.

The inhibition of TCE oxidation by carbamazepine, resulting in a decrease of TCOH formation, was characterized. Concentration-dependent inhibition data of TCOH formation with carbamazepine was obtained and regression analyses were performed (Figure 2.8). The results indicate that partial non competitive inhibition model best describes the kinetic data ( $R^2 > 0.99$ ), as follows:



**Figure 2.6** Impact of drugs ( $10X C_{max}$ ) on TCOH and TCA appearance following oxidation in human liver microsomes ( $n=5$ ) exposed to TCE (0.011 mM). Incubations were performed for 120 min at 37 °C and 150 rpm using a microsomal protein concentration of 2 mg/ml. Error bars represent the standard deviation (SD). \*:  $p < 0.05$ .

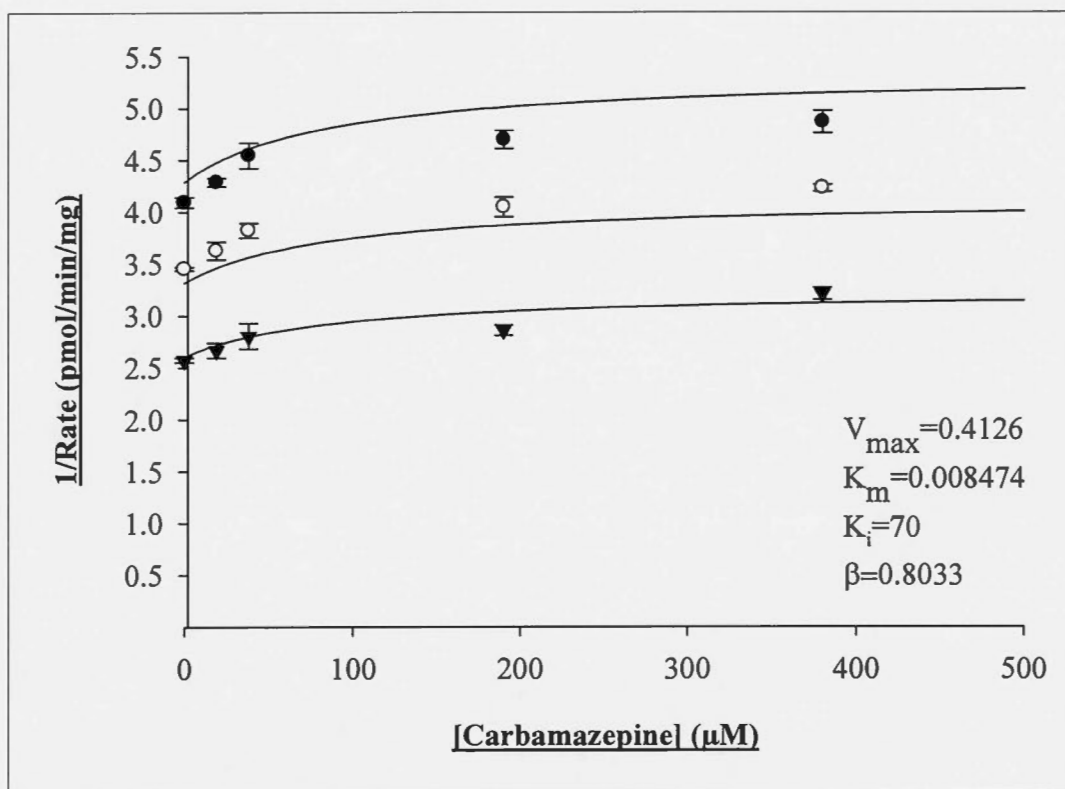
$$\text{Velocity} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_{\text{mapp}}}{C}\right) \times \left(1 + \frac{C_i}{K_{\text{iapp}}}\right) \left(1 + C_i \times \frac{\beta}{K_{\text{iapp}}}\right)} \quad (2.2)$$



**Figure 2.7** Michaelis–Menten kinetics for TCOH appearance following oxidation in human liver microsomes ( $n=3$ ).

Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 120 min and agitated at 150 rpm. Substrate concentrations were 0.006, 0.011, 0.022, 0.057, and 0.114 mM. Error bars represent the standard deviation (SD).

where  $C$  and  $C_i$  refer to the substrate and inhibitor concentrations, respectively and  $\beta$  is a constant. The estimated values of  $K_{iapp} = 70 \mu\text{M}$  and  $\beta = 0.8033$ .



**Figure 2.8** Dixon plots for inhibition of trichloroethanol (TCOH) formation by carbamazepine in human liver microsomes (n=3).

Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 120 min and agitated at 150 rpm. Three substrate [0.011 (●), 0.022 (○), and 0.114 mM (▼)] and 5 inhibitor (0, 19, 38, 190, and 380 μM) concentrations were used. Error bars represent the standard deviation (SD).



## 2.4 Discussion

Evidence of co-exposure to drug-pollutant modulation effect on trichloroethylene metabolism exists in the literature, but only for very few drugs. Recently we completed, *in vitro* in rat, screening of metabolic interactions between trichloroethylene and 14 widely used drugs. Most potent identified metabolic interactions were also characterized. The results that were obtained motivated us to explore such metabolic interactions between trichloroethylene and the same 14 widely consumed drugs in human *in vitro* material. Among the 14 tested drugs, 5 presented the most potent interactions and were selected for confirmation with microsomes, namely naproxen, salicylic acid (group 2), acetaminophen, carbamazepine (group 3), and valproic acid (group 4). Group 2 and 3 drugs affected respectively by increasing and decreasing both metabolite levels, while action of those of group 4 was limited to either TCA or TCOH and clearly less pronounced, except for valproic acid. Although this drug affects only one metabolite, it was selected for confirmation based on the strength of its interaction ( $p \leq 0.001$ ) and the similarity with the *in vitro* response in rats. Group 1 drugs showed no effect on TCE metabolism and obviously did not interact in any significant manner with the metabolic pathways used by TCE.

There are some limitations to the use of cryopreserved suspended hepatocytes for *in vitro* investigation and several factors can affect the observed response of a drug (Li, 2007). The expression level of involved enzymes and the activity of concerned membrane transporters may be different from *in vivo* situation. Depletion of hepatocyte cofactors (e.g., UDPGA and GSH) may also occur more rapidly (Li, 2007). Because of these factors, interaction with the metabolism of TCE may exist, but could be less observable *in vitro* using hepatocytes. A lack of interaction during such *in vitro* investigation should not be interpreted as a total absence of interaction

for the concerned drug, as the *in vivo* situation can be different. Therefore, we cannot definitely conclude that no interactions exist *in vivo* if we do not observe in cryopreserved hepatocyte suspensions any interaction between a drug and the metabolism of TCE. On the other hand, one must consider that hepatocytes are better reflection of *in vivo* condition, than subcellular fractions. Interactions observed with hepatocytes may never be made in subcellular fractions such as microsomal system. That is the case for interactions such as cofactor depletion, where hepatocytes should theoretically be closer to *in vivo* situation, unlike micromal incubations where cofactor are used in excess.

The second part of our study was focused on confirming and characterizing the interactions, that were most pronounced, using human liver microsomes. The metabolic interactions with salicylic acid, valproic acid, and acetaminophen, observed in hepatocytes, were not detected when co-incubations were performed in human microsomes. In the case of salicylic acid, the difference in interactions between both incubation mediums could be explained by i) a possible inhibition of glucuronidation by the drug's metabolite in the hepatocyte system, that would not be generated in the microsomal assay, or by ii) a possible disruption of the UDPGA homeostasis. Similar results in rat (i.e., hepatocytes vs. liver microsomes) have already been reported with the same drug (Cheikh Rouhou *et al.*, 2012). This also has been observed for *n*-nonylphenol and bisphenol A with the same drug (Verner *et al.*, 2009). It is noteworthy to mention that Zielińska-Psuja *et al.* (1999) observed similar results, as for salicylic acid *in vivo* as the ones obtained with hepatocytes. They hypothesized that the increase of metabolite levels (i.e. TCA and TCOH) may result from an induction of CYP450. This may be an explanation, but it is unlikely that significant induction occurred during the time of incubation. Induction of transcription mechanisms is unlikely to occur, however, protein stabilisation may be an alternate mechanism to consider for the *in vitro* short incubation period. It is of importance to

clarify that the fact that these interactions that were observed in hepatocytes were not detected in microsomes, does not signify they will not occur *in vivo*. It simply means that our original hypothesized mechanism of interaction (i.e., direct inhibition of glucuronidation) is not confirmed.

Similarly to salicylic acid, the decreases of metabolite levels, observed with acetaminophen (TCOH and TCA) and valproic acid (TCOH) in human hepatocytes, have not been confirmed with microsomes. This suggests that these two drugs do not directly inhibit CYP450 in human tissues. Further investigations are still needed to elucidate the mechanism of these inhibitions.

Among the drugs that showed strong interactions with TCE in hepatocytes, naproxen and carbamazepine were the only ones that were positively confirmed using microsomes. Increased levels of metabolites, i.e. TCA and TCOH, induced by naproxen can be explained by an inhibition of the enzyme responsible of glucuronidation, since it is the main route of biotransformation of this drug by isoform UGT2B7. This hypothesis is supported by the validation with human microsomes and is consistent with the *in vitro* rat results (Cheikh Rouhou *et al.*, 2012). Interaction assays, conducted in rat liver microsomes, indicate a partial competitive inhibition of trichloroethylene biotransformation by naproxen. A similar result was also reported by Verner *et al.* (2009); their investigation show that n-nonylphenol and bisphenol A biotransformations are competitively inhibited by naproxen.

Decreased levels of TCE metabolites i.e. TCOH and TCA, caused by carbamazepine, may be explained by an inhibition of CYP450 as confirmed by microsomal assays. This antiepileptic drug (AEDs) is metabolized by cytochrome P450 CYP3A4,

CYP2C8, CYP2A6 and CYP1A2 (Caraco *et al.*, 1995; Pelkonen *et al.*, 2001a). The latter, i.e. CYP1A2, is an enzyme which also involved in the metabolism of TCE.

Naproxen and carbamazepine have known modulation effects on CYP450 enzymes and some UGT activities. The work of Masubuchi *et al.* (2001) supports that CBZ is a potent inhibitor of CYP450 and particularly of CYP1A1/2; an enzyme involved in the metabolism of both TCE and CBZ (Mesdjian *et al.*, 1999). As for naproxen, this drug is known to interact with several compounds (<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00788>) due to its strong ability to inhibit some enzymes and membrane transporters (Mulato *et al.*, 2000; Shitara *et al.*, 2002) and its high protein binding rate (Banerjee *et al.*, 2006). These characteristics of naproxen and carbamazepine are in accordance with what have been observed as direct interaction of these two drugs with TCE metabolizing enzymes.

The calculated  $K_{iapp}$  values for naproxen and carbamazepine were respectively 2,328.6 micromolar ( $\mu\text{M}$ ) and 70  $\mu\text{M}$ . These  $K_{iapp}$  values are greater than the maximum concentration in human blood published in the literature, indicating that a significant metabolic interaction at the therapeutic level is unlikely to occur. Although for carbamazepine  $K_{iapp}$  is closer to  $C_{max}$ , but still higher approximately by a factor of 2. To further assess the probability that such metabolic interactions occur at the therapeutical level, calculations were made for a population exposed to TCE at relevant environmental concentrations and medicated with naproxen or carbamazepine. The formation rate of TCOG in the presence of naproxen at maximal therapeutical concentrations was found to decrease by approximately 50% compared to a simple TCE exposure. A consequence of this TCOG formation would likely be increases in blood and tissue TCOH and TCA levels. This may therefore increase risk of toxicity. While for carbamazepine, the formation rate of TCOH showed a reduction of approximately 10% compared to a simple TCE exposure. This TCOH

decrease could lead to slightly lower TCA levels than expected. It is therefore unlikely to have significant impact on the risk of toxicity.

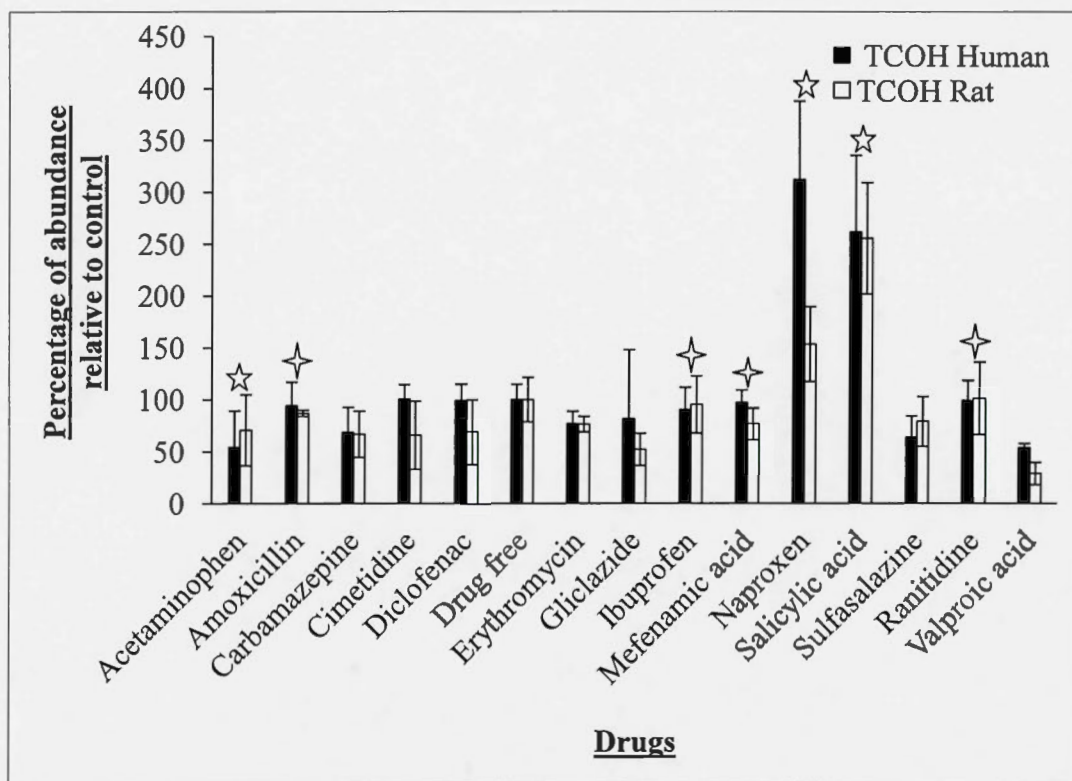
#### 2.4.1 Human–rat comparison of metabolic interaction in hepatocytes

It's interesting to assess the similarity of interactions in human and rat, by comparing the *in vitro* obtained results. The observed interactions in hepatocytes show an overall global similarity (Figures 2.9 and 2.10). Drugs that behave similarly in both species, with respect to interactions (or no interaction) with TCE metabolism in hepatocytes, are: amoxicillin, ibuprofen, mefenamic acid and ranitidine which show no interactions (group 1); naproxen and salicylic acid which increase both metabolite levels (group 2); acetaminophen which decreases levels of both metabolites (group 3); and sulphalazine which affects only one metabolite.

The compounds that behave differently in both species are cimetidine (group 3 in rats and 1 in humans), carbamazepine (group 1 in rats and 3 in humans), diclofenac (group 3 in rats and 4 in humans), gliclazide (group 3 in rats and 4 in humans), erythromycin (group 4 in rats and 3 in humans), and valproic acid (group 3 in rats and 4 in humans). Even sulphalazine, which is in group 4 in both species, shows some differences by affecting TCOH levels only in humans, unlike in rats where only TCA levels are altered. These differences clearly indicate some enzymatic mechanistic differences in both species.

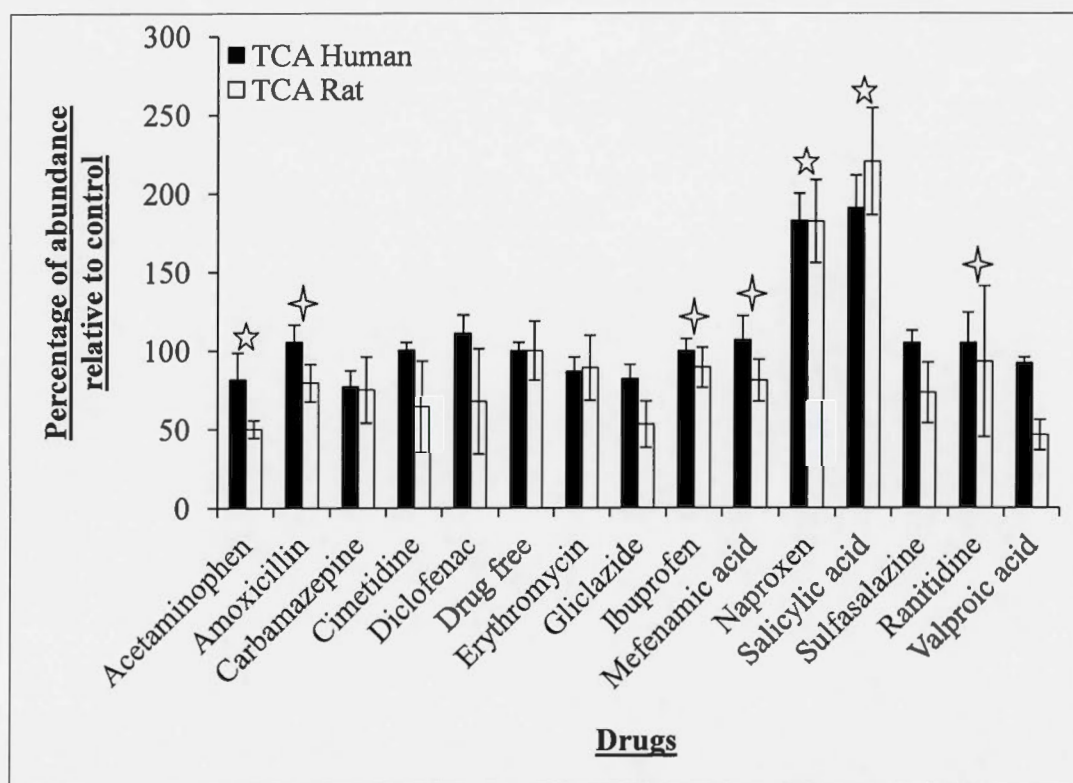
Several investigations reported similarities between involved enzymes in TCE metabolism in human and rat. CYP2E1, CYP1A1/2, CYP2B1/2 and CYP2C11/6 have been proved to be involved in TCE biotransformation (Lash *et al.*, 2000a).





**Figure 2.9** Comparison of modulation profile for trichloroethanol (TCOH) formation by drugs in suspended human and rat hepatocytes exposed to TCE (n=5). Samples were incubated with TCE (0.01  $\mu$ M) at 37 °C for 120 min and agitated at 150 rpm. Initial drug concentrations were equal to 10 times the maximum plasma concentrations following a therapeutic dose in humans (10XC<sub>max</sub>). Error bars represent the standard deviation (SD). Similarities between humans and rats are highlighted: ☆ for common interactions and + for common absence of interactions. Rat data are taken from Cheikh Rouhou *et al.* (2012).

These similarities can explain the resemblance of observed response for some drugs in human and rat. But, besides these proven similarities, differences in expression level of these enzymes have also been demonstrated. Published results by Lipscomb *et al.* (1998) illustrate such expression discrepancy for CYP2E1; one of the main enzymes involved in TCE biotransformation, which has been found to be very high in rat compared to human. Lipscomb *et al.* (1996) reported also that, compared to rat, CH biotransformation into TCOH in human is only half of what was observed in



**Figure 2.10** Comparison of modulation profile for trichloroacetic acid (TCA) formation by drugs in suspended human and rat hepatocytes exposed to TCE ( $n=5$ ). Samples were incubated with TCE ( $0.01 \mu\text{M}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  for 120 min and agitated at 150 rpm. Initial drug concentrations were equal to 10 times the maximum plasma concentrations following a therapeutic dose in humans ( $10\text{XC}_{\text{max}}$ ). Error bars represent the standard deviation (SD). Similarities between humans and rats are highlighted: ☆ for common interactions and + for common absence of interactions. Rat data are taken from Cheikh Rouhou et al. (2012).

animal, but TCA elimination is three times higher. Finally, Lash *et al.* (2000a) revealed that expression level of carriers is 10 times higher in human compared to rat. Their investigation support that GSH and GGT activity level in human liver is 10 times higher compared to rat. These differences between human and rat affect not only TCE metabolism, but most likely also affect the existence and/or the magnitude of metabolic interactions with selected drugs.



#### 2.4.2 Human–rat comparison of metabolic interaction in microsomes

For human and rat, while validating with microsomes, no interaction was detected for salicylic acid and acetaminophen. This suggests that these two drugs do not present a significant direct interaction with the enzymes involved in the metabolism of TCE. However, more investigation is still needed to understand the mechanism of the observed interaction with hepatocytes. Validation of interactions in microsomes was positive in both species only with naproxen. Nevertheless, the results show that the mechanisms of interaction are different: a complete competitive inhibition of TCOH glucuronidation was observed in human ( $K_i=2328.6 \mu\text{M}$ ), whereas it was rather a partial competitive inhibition in rat ( $K_i=211.6 \mu\text{M}$ ). There are similarities between human and rat in the mechanism of TCE biotransformation in both species, as described in literature (Lipscomb *et al.*, 1998; Wrighton et Stevens, 1992). But despite these similarities, our investigations also highlight some important disparities (i.e. differences in mechanism of interactions and in  $K_i$  values by an order of magnitude).

Reactions with microsomes are intended to assess substrate formation or depletion. Our experiments did not include any control without added specific cofactors. Oxidation or glucuronidation specific cofactors were always added to these controls.

## 2.5 Conclusion

*In vitro* metabolic interactions between trichloroethylene and 14 widely used drugs have been explored, using human hepatocytes. Most potent identified drug-TCE interactions have been confirmed and characterized, using human liver microsomes. Comparison of this research using human material and our published results with rats revealed an overall global similarity, but also highlighted some important disparities (differences in mechanism of interactions and in  $K_i$  values). *In vivo* exploration is then required as next step in our research project, for adequate assessment of metabolic interaction risk to human health between trichloroethylene and the fourteen selected widely used drugs.

## 2.6 Funding information:

This work was supported by a Discovery Grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

## 2.7 Acknowledgments

We would like to thank Isabelle Rheault for her technical assistance.

### CHAPITRE III

#### *IN VIVO* IMPACT OF NAPROXEN, SALICYLIC ACID, AND VALPROIC ACID ON THE PHARMACOKINETICS OF TRICHLOROETHYLENE AND METABOLITES IN RATS

Mouna Cheikh Rouhou<sup>1</sup>, Ginette Charest-Tardif<sup>2</sup> and Sami Haddad<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> TOXEN, Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal,  
C.P. 8888 Succ. Centre-ville, Montreal, Canada, H3C 3P8

<sup>2</sup> Département de Santé Environnementale et Santé au Travail, chaire d'analyse et de  
gestion des risques toxicologiques, IRSPUM, Faculté de Médecine, Université de  
Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montreal, Canada, H3C 3J7

Soumis pour publication dans Journal of Toxicology and Environmental Health

Mouna Cheikh Rouhou : approche expérimentale, développement de la méthode  
expérimentale, réalisation des expériences et rédaction de l'article.

Ginette Charest-Tardif: développement de la méthode expérimentale et support dans  
la réalisation des expériences.

Sami Haddad : approche expérimentale, correction et révision de l'article.

## Abstract

We recently reported solid evidence that some drugs have the ability of modulating the *in vitro* metabolism of trichloroethylene (TCE) in human and rat tissues. The objective is to assess *in vivo* the significance of the observed interactions between TCE and three selected drugs. Naproxen, valproic acid, and salicylic acid were selected for the strength and the similarity of their *in vitro* responses in human and rat. Animal groups were exposed during 6 hours to 50 ppm of TCE in inhalation chambers. Control and naproxen treated groups were composed by 8 rats, while those who were administered valproic acid and salicylic acid contained 4 only. Drugs were administered to designated group animals, an hour before the end of exposure to trichloroethylene, as an oral dose equivalent to 10 times the recommended daily intake (mg/kg); i.e. 150 mg/kg for naproxen, 100 mg/kg for salicylic acid and 50 mg/kg for valproic acid. Samples of blood, urine, and various tissues collected at different time points were analyzed by headspace-GC coupled to an electron capture detector, to determine levels of TCE and metabolites (i.e., trichloroethanol [TCOH] and trichloroacetate [TCA]).

Results show that co-exposure to naproxen and TCE significantly increases (up to 50 %) TCOH<sub>total</sub> and TCOH<sub>free</sub> levels in blood. This modulation effect of naproxen was found to be significant up to 90 minutes after the end of co-exposure for TCOH<sub>free</sub> and during 2-hr period for TCOH<sub>total</sub> ( $p \leq 0.05$  for TCOH<sub>free</sub> and  $p \leq 0.001$  for TCOH<sub>total</sub>) and can be explained by an inhibition of glucuronidation.

Analyses of collected samples from animals co-exposed to valproic acid or salicylic acid and TCE revealed a significant increase (up to 50 %) of TCE levels in blood ( $p \leq 0.05$ ) for valproic acid. Peak levels were recorded at 30 and 120 min after the end of co-exposure. The effect of these two drugs on TCOH levels is quite different. No significant effect of valproic acid on blood TCOH levels was detected, but a significant increase in TCOH<sub>total</sub> concentrations in urine was recorded ( $p \leq 0.05$ ). Salicylic acid, on the other hand, was found to be responsible of an increase of TCOH<sub>total</sub> levels in blood at 30, 60, and 90 minutes after the end of co-exposure and in urine ( $p \leq 0.05$ ).

Finally, only naproxen had a significant ( $p \leq 0.05$ ) impact on TCA in collected organs since an increase in level of this metabolite in the liver has been observed.



The results of this research confirm that the three selected drugs (naproxen, valproic acid, and salicylic acid) affect the *in vivo* TCE kinetics. Future efforts should be directed to evaluate if populations, chronically medicated with the considered drugs, have greater health risks related to TCE exposure.

Key words: Trichloroethylene, metabolism, interactions, rat, salicylic acid, naproxen, valproic acid.

### 3.1 Introduction

A variety of industries use trichloroethylene (TCE), the volatile chlorinated hydrocarbon solvent, in a large spectrum of applications (US Environmental Protection Agency (EPA), 1985; Wu et Berger, 2007). Despite increasing evidence of the possible health risk of this chemical at relevant concentrations (Clewell *et al.*, 2000), humans are still frequently exposed to trichloroethylene. Besides this possible simple exposure to TCE, co-exposure situations to this chemical in combination with other substances may occur. The ever-increasing consumption of drugs strengthens concerns about a possible modulating effect resulting from co-exposure to TCE in conjunction with potential interfering medications. Pharmaceuticals, which are biologically active, may influence the metabolism of trichloroethylene in the liver and consequently affect its pharmacokinetics and/or its pharmacodynamics and therefore its toxicity in the target tissue. Toxicokinetic interactions with TCE have recently been reported for few drugs, specifically aspirin and acetaminophen (Plewka *et al.*, 2000; Zielińska-Psuja *et al.*, 2001). But no other toxicokinetic interactions data can be found for other drugs in the literature. In a recently published paper, we presented evidence that some pharmaceuticals, among a tested selection of 14 widely consumed drugs, can modulate the *in vitro* metabolism of TCE in rat (Cheikh Rouhou *et al.*, 2012). We also reported similar evidence of such *in vitro* interactions in human (Cheikh Rouhou et Haddad, 2013). Based on these human and rat *in vitro* investigation results, three drugs have been selected for an *in vivo* in rat investigation. Naproxen, salicylic acid and valproic acid were selected based on their *in vitro* responses and similarity of observed interactions in human and rat.

TCE is metabolized in the liver, mainly by oxidation. In this pathway, TCE is first biotransformed into chloral hydrate (CHO), predominantly by the action of CYP2E1 (Lipscomb *et al.*, 1997; Nakajima *et al.*, 1992a). Then, the chloral hydrate is

transformed either by oxidation to trichloroacetic acid (TCA), or by reduction to trichloroethanol (TCOH). GSH-conjugation is the other route of biotransformation. This pathway is secondary, taking place also in the liver (Lash *et al.*, 2000b). In the first step, a glutathione conjugate which is the S-(1, 2-dichlorovinyl) glutathione (DCVG) (GST) is formed with catalytic action of the glutathione S-transferase. The DCVG is then metabolised by the  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGTP) to free glutamic acid and cysteine conjugate form (Dekant *et al.*, 1990).

Naproxen (NA) is a propionic acid derivative related to the arylacetic acid group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). This pharmaceutical has analgesic and antipyretic properties. It is rapidly and completely absorbed from the gastrointestinal tract, with an *in vivo* bioavailability of 95 %. The elimination half-life of naproxen range is 12 to 17 hours (Niazi *et al.*, 1996). This drug is extensively metabolized in the liver to 6-O-desmethyl naproxen. Both parent and metabolites do not induce metabolizing enzymes. Naproxen and 6-O-desmethyl naproxen are further biotransformed to their respective acyl glucuronide conjugated metabolites (Toothaker *et al.*, 2000).

Acetylsalicylic acid (ASA) is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), with analgesic and antipyretic properties. This pharmaceutical is rapidly hydrolysed to salicylic acid (2-hydroxybenzoic acid, SA) in the intestinal wall, liver, and red blood cells (Patel *et al.*, 1990). Approximately 80 % of the resulting salicylic acid is further biotransformed in the liver by conjugation with either glycine or glucuronic acid, or by oxidation. The salicyluric acid, which is the glycine conjugate, is the most abundant metabolite in the urine of persons who received a therapeutical dose of salicylic acid. The glucuronide conjugates of salicylic acid, i.e. salicylic acid phenolic glucuronide (SAPG) and salicylic acid acyl glucuronide (SAAG) (Caldwell *et al.*, 1980; Cummings *et al.*, 1966), represent between 0.8 % and 42 % of the administered

dose (Hutt *et al.*, 1986). Small amount of salicylic acid is hydroxylated to gentisic acid. Salicylates are excreted mainly by the kidney as salicyluric acid (75 %), free salicylic acid (10 %), salicylic acid phenolic glucuronide (10 %), salicylic acid acyl glucuronide (5 %), and gentisic acid (< 1 %). The elimination half-life of salicylic acid is about 2 to 3 hours (Caldwell *et al.*, 1980; Cummings *et al.*, 1966; Emudianughe *et al.*, 1986; Spiller *et al.*, 2000).  $T_{\max}$ , the required time to reach  $C_{\max}$ , for salicylic acid is approximately 60 min (Kiang *et al.*, 2006).

Valproic acid (VA) is a wide-spectrum antiepileptic drug prescribed to children and adults in the treatment of several forms of epilepsy and types of seizure. The antiepileptic action of this drug is associated with a regional change of the neurotransmitter  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) concentrations (Perucca, 2002; Shorvon, 1990). Several studies demonstrated that valproic acid administration is responsible of increased levels of GABA in the brain, therefore enhancing the GABAergic transmission in specific brain regions (Owens et Nemeroff, 2003). Valproic acid is almost entirely metabolized in the liver, which is also the principal target organ of valproate toxicity. Biotransformation of valproic acid in extrahepatic tissues (e.g. skin, gastrointestinal tract, lung, and kidney) has minor contribution and still vaguely understood. Multiple metabolic pathways are engaged in valproic acid biotransformation, with more than 50 known resulting metabolites. Valproic acid is excreted mainly in the urine, with minor quantities in feces and expired air.

Metabolic interactions between TCE and potential interfering drugs need to be explored for adequate human TCE exposure risk assessment and management. Our previous *in vitro* in human and rat results revealed evidence that some drugs have the potential to modulate the health risk related to trichloroethylene exposure. From the 14 previously *in vitro* tested drugs, three have been selected for this *in vivo* research in rat. Naproxen, salicylic acid and valproic acid have been elected for the strength of

their observed interactions and the similarity of their *in vitro* in human and rat responses.

The objective of this *in vivo* study is to validate presence of the observed *in vitro* interactions between TCE and selected drugs. Collected toxicokinetic interactions data will be used for a projected extrapolation and modelling of health risk modulating effect of the concerned drugs on TCE exposure.

## 3.2 Material and methods

### 3.2.1 Chemicals and animals

Male Sprague–Dawley rats were purchased from Charles River Laboratories (St–Constant, Qc, Canada). TCA (99 %) was supplied by Anachemia Science (Montreal, Qc., CANADA). TCE, TCOH, Methanol (HPLC, 99.8 %), Sulphuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 95 %–98 %), Valproic acid (VA, 100 %), Naproxen (NA, 98 %), and Salicylic acid (SA, 99.9 %) came from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Finally, Alkamuls (EL–620), a polyethoxylated vegetable oil, was purchased from Debro Chemicals (Dorval, Qc., CANADA).

### 3.2.2 Exposure schemes

*In vivo* exposures were performed in the summer season on adult male Sprague–Dawley rats weighing approximately  $250 \text{ g} \pm 10 \%$ . The animals were kept under standard conditions (humidity 48 %, temperature  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , 12 / 12 h light/dark cycle) and were fed the standard granulated chow with access to water. The experimental protocol was approved by the University of Quebec in Montreal (UQÀM) and the University of Montreal animal care committees. Rats were treated and handled in accordance with the guidelines dictated by the Canada council of animal care.

Two groups of rats were exposed in 500 L inhalation chambers either to TCE (50 ppm) alone, or in combination with one of the selected drugs (i.e., naproxen, valproic acid, or salicylic acid), for 6 hours. TCE was delivered in the chamber with a

high pressure liquid chromatography (HPLC) in the intake hose, where it was mixed with compressed air and swept clean by suction into the chamber. The concentration of TCE in the chamber, where the rats were exposed, was doubly controlled, in real time using a MIRAN SapphIRe Portable Ambient Analyzer (Thermo Scientific) and at intervals of 30 min by gas-chromatography coupled to flame ionization detection (GC-FID). This was done by injecting 1 ml samples of air from the exposure chamber into the gas chromatograph.

Exposure to TCE started at 8 AM. After 5 hours, co-exposed rats were administered by gavage a dose equivalent to 10 times the recommended daily intake (in mg/kg) of the selected drug dissolved in a solution alkamus 5 %. TCE exposure was stopped after 6 hours, i.e. at 2 PM. Co-exposure period length selection was based on drug  $T_{max}$ ; which is one hour for salicylic acid and valproic acid (Al-Shareef *et al.*, 1997; Klotz et Antonin, 1977), and 2 to 4 h for naproxen (Niazi *et al.*, 1996). Blood samples were collected immediately after at selected times, i.e. 2 min, 30 min, 60 min, 90 min, and 120 min after end of exposure. Urine was collected during the night. 24 hours after the beginning of exposure, animals were euthanized and various tissue samples (liver, kidney, and lungs) collected. All samples were analyzed by headspace-GC coupled to an electron capture detector (ECD) to determine the levels of TCE and its metabolites (i.e. TCOH and TCA).

### 3.2.3 Chemical analysis of air chamber

The chamber air was analyzed for TCE by GC-FID (HP 5890 A, Agilent). With a pump, 1 ml of air samples were injected from the exposure chamber into a HP-1/30 column: (0.53 mm ID; 2.65  $\mu$ m film thick; 50 phase ratio) in a split mode (20:1). Helium (He) was used as mobile phase and injection was regulated to a rate of



20 ml/min. Temperature parameters for the column, injector, and detector were respectively 70 °C, 120 °C, and 250 °C. Temperature ramp-up was set at 20 °C/min and the retention time of TCE at 2.008 min. A Tedlar bag, with a capacity of 21 L containing 50 ppm of TCE in air, was used to calibrate the chamber TCE concentration.

#### 3.2.4 Chemical analysis of biological samples

Tissue, urine, and blood samples were analysed for TCE, unconjugated TCOH ( $\text{TCOH}_{\text{free}}$ ), total TCOH ( $\text{TCOH}_{\text{total}}$ ), and TCA by headspace gas chromatography coupled to electron capture detection (HS-GC-ECD). For TCE and  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  analyses, 30  $\mu\text{l}$  aliquot of blood were transferred into 10 ml vials. For  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  or TCA analysis, 10  $\mu\text{l}$  aliquot of urine, 30  $\mu\text{l}$  aliquot of blood, and 50  $\mu\text{l}$  aliquot of homogenate were transferred into 10 ml vials containing 150  $\mu\text{l}$  of the esterification solution. Made from Milli-Q purified water, sulphuric acid, and methanol ( $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{methanol}$ , 6V:5V:1V), the esterification solution is used to enable volatilization of acetates. Homogenates of collected organs were prepared using a small portion (0.15–1.0 g) of each tissue, which had been rapidly blotted to remove excess blood and transferred into a 10 ml scintillation vial containing 4 ml of ice-cold 0.9 % saline solution. The tissue was homogenized for less than 20 s with an Ultra-Turrax homogenizer (Tekmar, Cincinnati, OH, USA). All vials were capped with PTFE-lined rubber septa, crimped tightly, vortexed, and placed into the GC headspace autosampler for analysis.

To quantify TCE and its metabolites (TCA and TCOH) by the GC-ECD, equipped with a "headspace" (Combi Pal HS) auto sampler, vials were preheated to 60 °C for 10 min for TCE and  $\text{TCOH}_{\text{free}}$ , or to 85 °C for 60 min for TCA and  $\text{TCOH}_{\text{total}}$ . The

headspace samples were then injected in a HP-5MS column (30 mX0.25 mm IDX0.25 microns film thickness) in split mode (1:10 for TCE and  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  in blood, 1:50 for  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  and TCA in blood, and 1:100 for  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  and TCA in urine and tissues). Helium (He) was used as mobile phase and the injection took place at a rate of 1.3 ml/min. Analysis temperatures for column, injector, and detector were 250 °C, 200 °C, and 300 °C, respectively.

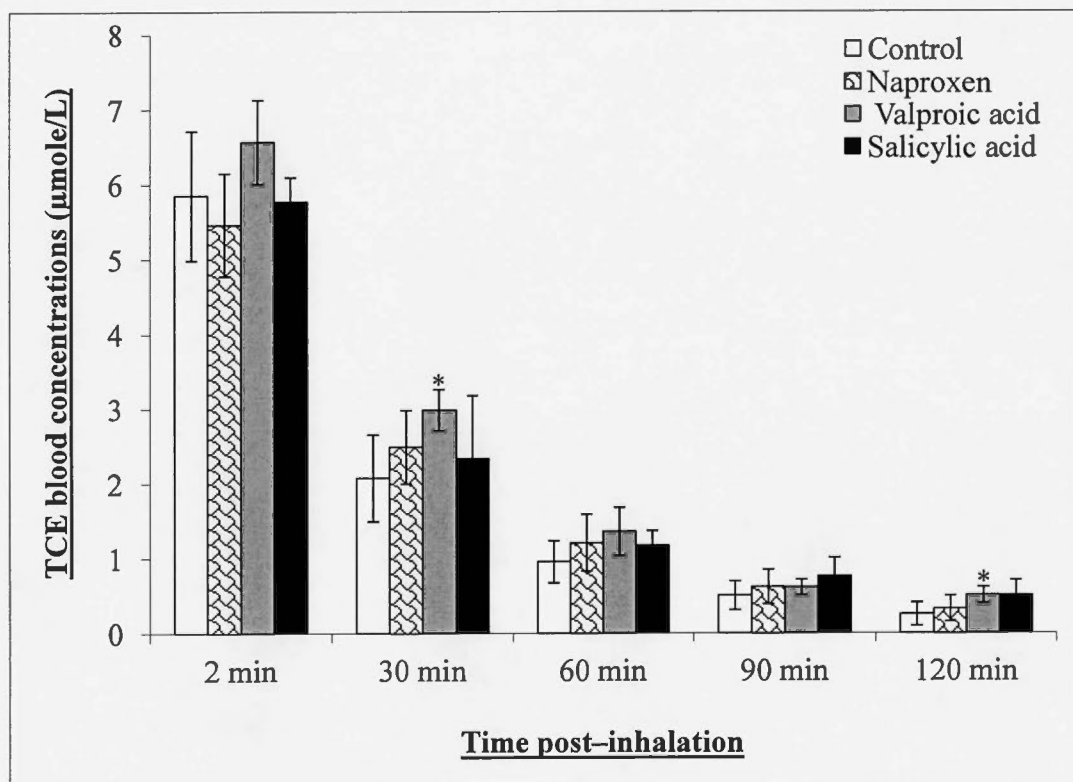
### 3.2.5 Data analysis and statistics

Concentrations of TCE, TCA, and  $\text{TCOH}$ , measured in collected samples from co-exposed animals, were compared to those from controls using the Mann-Whitney U test. Statistical analyses were computed using the Sigma Stat module version 3.11 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). Enzyme kinetic constants were calculated by non-linear regression model using SigmaPlot Enzyme Kinetics module version 9.01 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). The Mann-Whitney U test was used rather than the standard T-Test because it is more adapted to compare two independent small samples exhibiting large variation.

### 3.3 Results

#### 3.3.1 Effect of drugs on TCE blood levels

The effect of the three selected drugs, i.e. naproxen, salicylic acid, and valproic acid on TCE metabolism is illustrated in Figure 3.1. TCE blood concentration is shown for the three co-exposed groups as well as for controls, at 2, 30, 60, and 120 min after

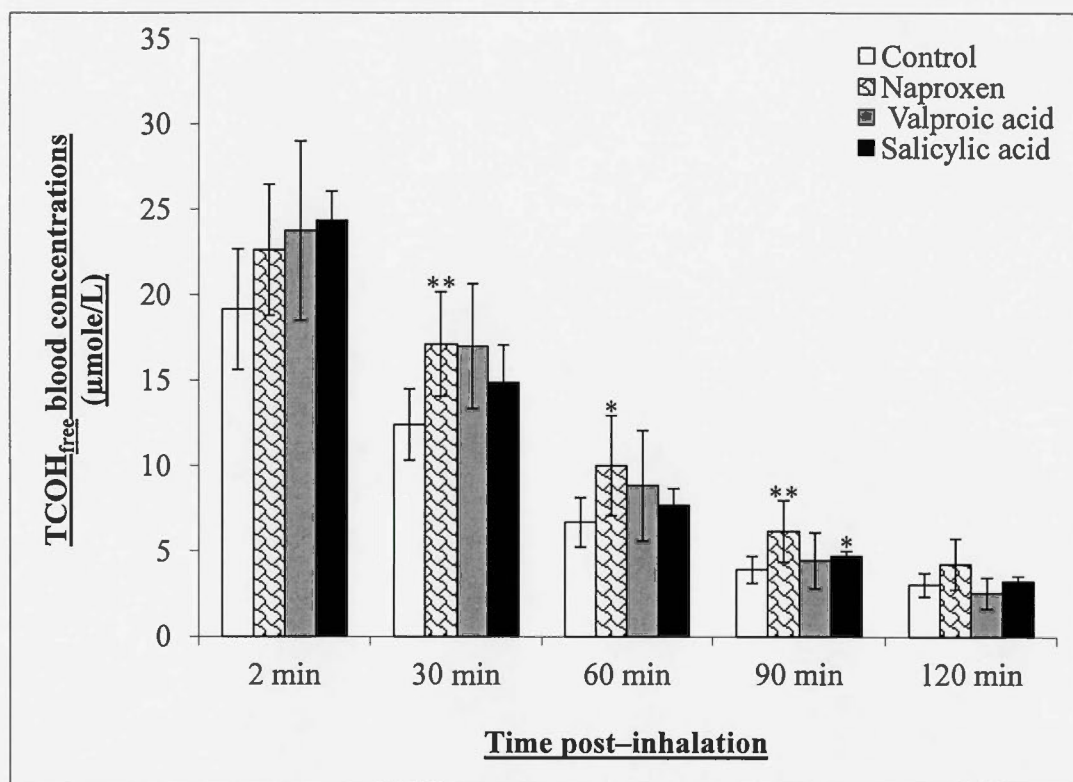


**Figure 3.1** Impact of naproxen, salicylic acid, and valproic acid at 10 times the therapeutic maximum dose in human on trichloroethylene levels in blood in rat. (n=4 for valproic acid and salicylic acid, n=8 for control and naproxen) exposed to TCE at 50 ppm for 6 hrs. Error bars represent the standard deviation (SD). \*:  $p < 0.05$ .

the end of exposure. The results show no statistically significant effect of salicylic acid and naproxen on nonmetabolized TCE blood levels. For valproic acid, a significant increase in nonmetabolized TCE concentration in the blood is clearly visible at 30 and 120 min after the end of exposure with  $p < 0.05$  ( $p=0.0135$  and  $0.0162$ , respectively). The area under the curve (AUC) of TCE vs. time is significantly increased by 23 % in presence of valproic acid.

### 3.3.2 Effect of drugs on $\text{TCOH}_{\text{free}}$ blood levels

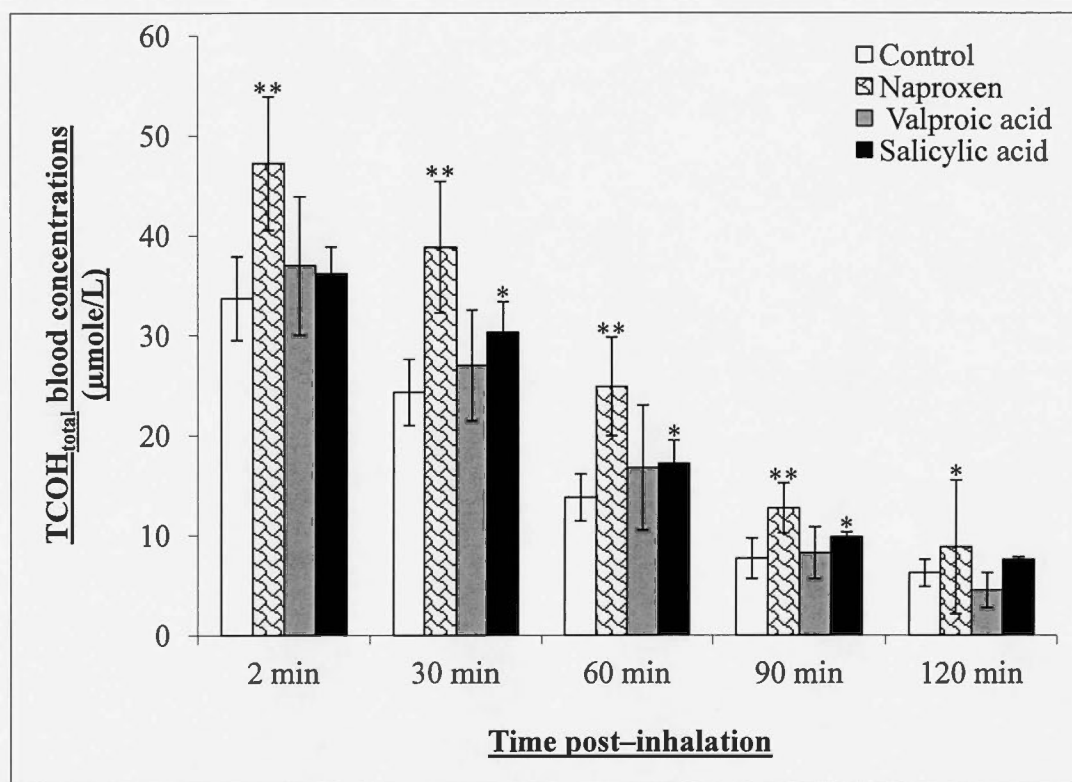
The concentrations of free TCOH ( $\text{TCOH}_{\text{free}}$ ) in blood are shown in Figure 3.2 for the three co-exposed groups, as well as for the control, at 2, 30, 60, and 120 min after the end of exposure. Although all drugs seem to increase the mean  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  levels at earlier times, statistically significant augmentations are observed with salicylic acid and naproxen at specific moments. For salicylic acid, a significant increase was noticed for  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  levels at 90 min following the end of exposure with  $p < 0.05$  ( $p=0.0485$ ). As for naproxen,  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  blood concentration surges occurred at 30, 60, and 90 min after the end of exposure with  $p < 0.05$  ( $p=0.003$ ,  $0.01042$ , and  $0.003$ , respectively).  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  blood levels increases, reported with naproxen co-exposure, ranged from 20 % to 60 %. Furthermore, naproxen significantly increased AUC of  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  by 35 %, and salicylic acid does this also by 23 %. Finally, for valproic acid, while there appears to be an increase in  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  levels in blood, no statistically significant effect is induced.



**Figure 3.2** Impact of naproxen, salicylic acid, and valproic acid at 10 times the therapeutic maximum dose in human on free trichloroethanol levels in blood in rat. (n=4 for valproic acid and salicylic acid, n=8 for control and naproxen) exposed to TCE at 50 ppm for 6 hrs. Error bars represent the standard deviation (SD). \*:  $p < 0.05$  and \*\*:  $p < 0.001$ .

### 3.3.3 Effect of drugs on $\text{TCOH}_{\text{total}}$ levels in blood and urine

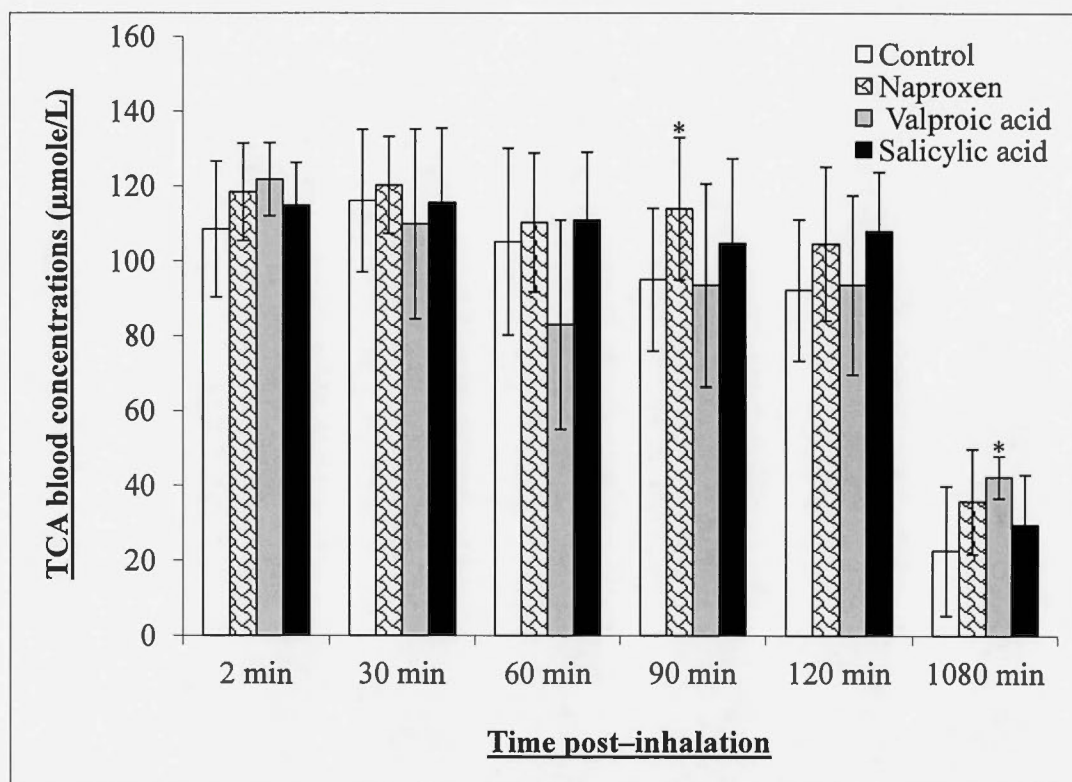
The concentration profiles of  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  in blood for the 4 groups of animals at 2, 30, 60, and 120 min following the end of exposure are depicted in Figure 3.3. The results reveal no significant effect for valproic acid. While for salicylic, a modest, but significant increase of  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  concentration was observed at 30, 60, and 90 min after the end of exposure with  $p < 0.05$  ( $p=0.0485$ ). Finally, naproxen induced a



**Figure 3.3** Impact of naproxen, salicylic acid, and valproic acid at 10 times the therapeutic maximum dose in human on total trichloroethanol levels in blood in rat. (n=4 for valproic acid and salicylic acid, n=8 for control and naproxen) exposed to TCE at 50 ppm for 6 hrs. Error bars represent the standard deviation (SD). \*:  $p < 0.05$  and \*\*:  $p < 0.001$ .

significant surge of TCOH<sub>total</sub> in blood throughout the entire sampling period following the end of exposure with  $p < 0.001$ . The recorded TCOH<sub>total</sub> increases with naproxen ranged from 40 % to 80 % throughout the 2-hrs post exposure period. The AUC of TCOH<sub>total</sub> in blood increased significantly by 58 % with co-exposure to naproxen, and by 20 % with salicylic acid. The effect of selected drugs on TCOH<sub>total</sub> in urine is illustrated in Figure 3.4. Average amounts of excreted TCOH<sub>total</sub> in urine are statistically significantly increased with co-exposure to the 3 selected drugs; by 50 % for naproxen, 10 % for salicylic acid and 23 % valproic acid.



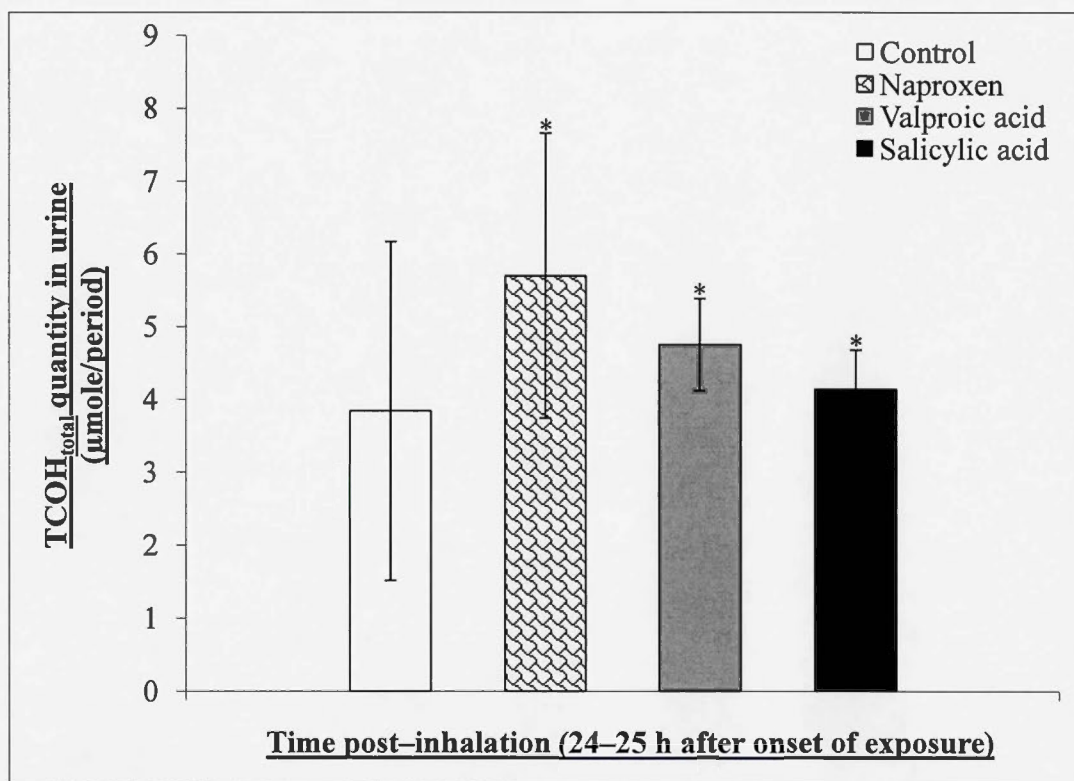


**Figure 3.4** Impact of naproxen, salicylic acid, and valproic acid at 10 times the therapeutic maximum dose in human on trichloroacetic acid levels in blood in rat. (n=4 for valproic acid and salicylic acid, n=8 for control and naproxen) exposed to TCE at 50 ppm for 6 hrs. Error bars represent the standard deviation (SD). \*:  $p < 0.05$  and \*\*:  $p < 0.001$ .

### 3.3.4 Effect of drugs on TCA in blood, urine and tissues

The blood concentrations of TCA are plotted for the three co-exposed, as well as for control groups, at 2, 30, 60, 90, 120, and 1080 min after the end of exposure (Figure 3.5). The effect of selected drugs, namely naproxen, salicylic acid, and valproic acid on TCA in blood is different from what were observed for  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  and  $\text{TCOH}_{\text{total}}$ . No effect of salicylic acid was observed and, the only statistically significant modulations recorded for the two other drugs were at 90 min for naproxen

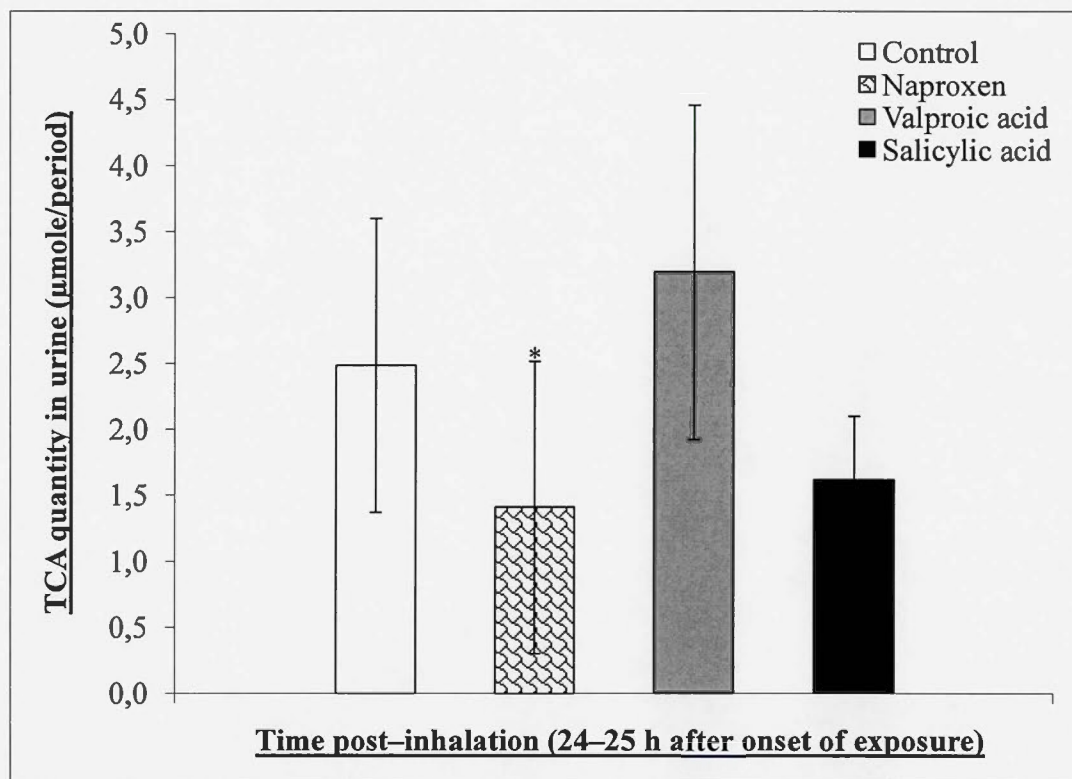




**Figure 3.5** Impact of naproxen, salicylic acid, and valproic acid at 10 times the therapeutic maximum dose in human on total trichloroethanol levels in urine in rat. (n=4 for valproic acid and salicylic acid, n=8 for control and naproxen) exposed to TCE at 50 ppm for 6 hrs. Error bars represent the standard deviation (SD). \*:  $p < 0.05$  and \*\*:  $p < 0.001$ .

( $p=0.0499$ ), and at 1080 min for valproic acid ( $p=0.0485$ ). The observed increase was modest (20 %) with naproxen and pronounced with valproic acid (87 %). Nevertheless, AUC were not significantly altered.

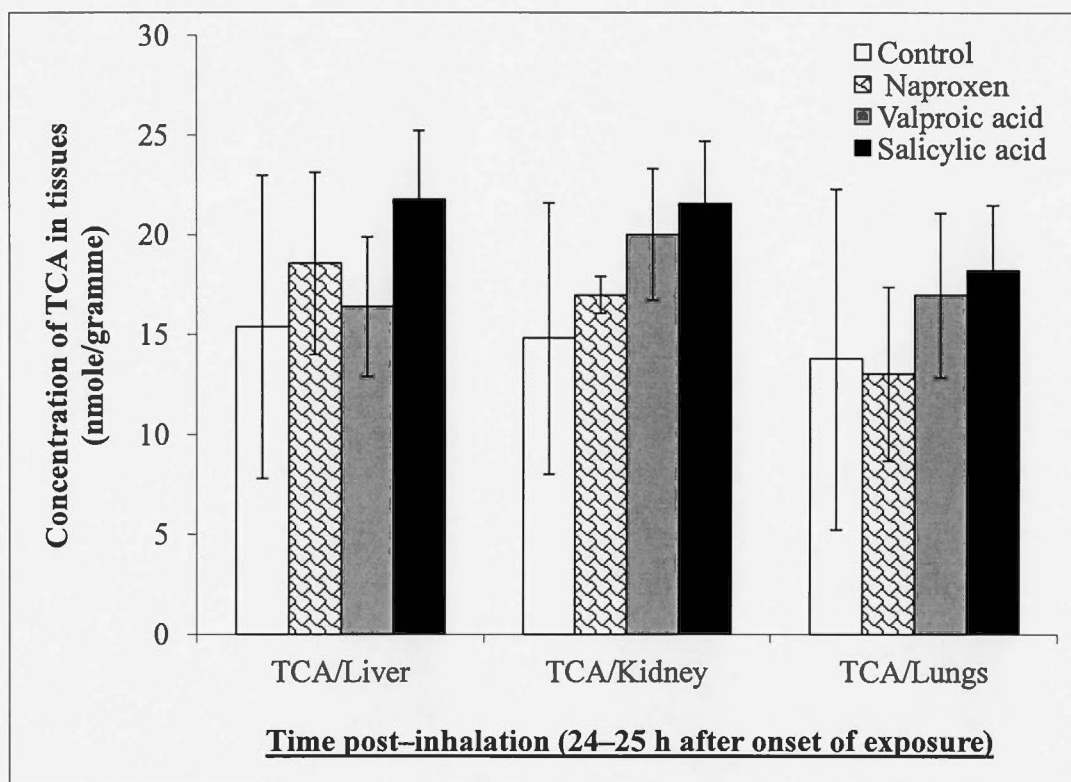
Urine collection period lasted for 12 hours and started 4 hours after the end of exposure. Analysis of urine for excreted TCA is depicted in Figure 3.6 for the same 4 animal groups. With exception of naproxen for which a statistically significant decrease compared to control (i.e., two-fold reduction) was observed with  $p < 0.05$



**Figure 3.6** Impact of naproxen, salicylic acid, and valproic acid at 10 times the therapeutic maximum dose in human on trichloroacetic acid levels in urine in rat. (n=4 for valproic acid and salicylic acid, n=8 for control and naproxen) exposed to TCE at 50 ppm for 6 hrs. Error bars represent the standard deviation (SD). \*:  $p < 0.05$  and \*\*:  $p < 0.001$ .

( $p=0.0238$ ), no other effect was reported for the two other drugs. The observed effects with salicylic acid (TCA decrease) and valproic acid (TCA increase) were not statistically significant.

Finally, analysis results for TCA of the three collected tissue samples are shown in Figure 3.7. Although means appear to differ from control in liver for naproxen and salicylic acid, and in the kidneys and lungs for valproic acid and salicylic acid, no statistically significant effect on TCA levels in the three organs were noted.



**Figure 3.7** Impact of naproxen, salicylic acid, and valproic acid at 10 times the therapeutic maximum dose in human on trichloroacetic acid levels in lung, kidney, and liver samples.

(n=4 for valproic acid and salicylic acid, n=8 for control and naproxen) exposed to TCE at 50 ppm for 6 hrs. Error bars represent the standard deviation (SD). \*:  $p < 0.05$  and \*\*:  $p < 0.001$ .

### 3.4 Discussion

Our published *in vitro* investigations in human and rat liver preparations revealed out that, among the 14 widely consumed tested drugs, three have a significant potential to interact with and modulate TCE metabolism (Cheikh Rouhou et Haddad, 2013; Cheikh Rouhou *et al.*, 2012). Our objective in the present study was to investigate whether the presence of metabolic interactions, that have been reported *in vitro* in human and rat tissues, are also present *in vivo*. Selected groups of rat have been exposed to TCE in combination with each one of the three selected drugs (naproxen, salicylic acid, and valproic acid). Modulating effects, resulting from metabolic interactions, were assessed by analysis of collected blood, urine, and tissues from co-exposed animals in comparison to those from controls (TCE alone).

#### 3.4.1 Naproxen

Our rat *in vivo* investigations show that naproxen is responsible for an increase of  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  and  $\text{TCOH}_{\text{total}}$ , but induces no modulation of nonmetabolized TCE concentrations in blood. In addition, an increase in  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  and a decrease in TCA in urine were observed with this drug. Finally, a marginal increase in TCA levels in liver was also noted ( $p=0.0051$ ). Published results by Wu et Berger (2007) report that TCE biotransformation generated  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  can be reabsorbed and converted into TCA. Furthermore, other investigations reported generation of TCA from glucuronidated trichloroethanol (TCOH), via enterohepatic recirculation (Lash *et al.*, 2000a). It was also suggested that TCA generation pathway from glucuronidated trichloroethanol is more important than the one involving  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  (Green et Prout, 1985; Sztajnkrzyer, 2002; Wu et Berger, 2007). TCA, one of trichloroethylene major metabolites, is known to be toxic and responsible of causing liver and low incidence

renal tumors in mice and rats (Bull *et al.*, 1990; Covington *et al.*, 2004; Hariton *et al.*, 1984; Herren-Freund *et al.*, 1987). Thus, this modulation of TCE metabolism may have consequences. According to these authors and known metabolic pathways, surge in  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  and  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  concentrations in blood should lead to increases in the level of TCA. Although this has barely been observed in blood levels during our experiments, the most significant changes in TCA levels were perceived in urine.

The observed decrease of excreted amounts of TCA in urine and its concentration increase in liver may indicate higher risk of liver tumor development. These results are in accordance with those of our previously published *in vitro* study in rat hepatocytes (Cheikh Rouhou *et al.*, 2012). The observed increase of  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  in blood, and  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  in blood and urine can be explained by an inhibition of glucuronidation. This hypothesis is supported by our previously obtained *in vitro* results that revealed in human liver microsomes a competitive inhibition of glucuronidation by naproxen ( $K_i=2.329$  mM) and a partial competitive inhibition in rat liver microsomes ( $K_i=211.6$   $\mu\text{M}$ ) (Cheikh Rouhou et Haddad, 2013; Cheikh Rouhou *et al.*, 2012).

Our previous *in vitro* results demonstrate that trichloroethylene metabolic pathways for humans and rats are qualitatively similar. Based on naproxen modulation effect revealed by the present *in vivo* investigation, the possibility of similar effect occurring in humans and resulting from a co-exposure to naproxen and trichloroethylene is plausible and should be seriously considered. This could be accomplished by adapting the Clewell *et al.* (2000) TCE PBPK model, by incorporating the identified interactions between TCE and naproxen. A validation of this model could be achieved using the already available *in vitro* and *in vivo* results, obtained during this study and our previous ones (Cheikh Rouhou *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 1990). This approach would allow simulating several co-exposure scenarios to TCE and



naproxen in humans. With the simulation results and risk evaluation, mitigation measures can be suggested such as new OEL (Occupational Exposure Limits) values for chronically medicated people.

### 3.4.2 Salicylic acid

Our *in vivo* experiments with rats show that nonmetabolised TCE and TCA concentrations in blood are not affected by salicylic acid. Analysis of TCA in urine and in collected organs (liver, kidneys, and lungs) also reported no modulating effect of this drug on TCE metabolism. The only observed effects were revealed by  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  in blood and  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  in blood and urine. This is corroborated by our previous *in vitro* studies in human and rat, but the mechanism of interactions could not be characterized using microsomes (Cheikh Rouhou et Haddad, 2013; Cheikh Rouhou *et al.*, 2012).

*In vivo* results reported no significant increase in TCA levels (but with large variability) and an increase in  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  in blood, not unlike what was observed in our *in vitro* studies in human and rat tissues. These results may indicate that this drug somehow induces the P450 enzymes involved in TCE biotransformation. Another possible explanation would be an effect on alcohol dehydrogenase which converts chloral to  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  (Fisher *et al.*, 1998; R. A. Clewell et H. J. Clewell, 2008), and/or a stimulation of the glucuronidation pathway.

Blood  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  concentration increase was observed *in vivo* only after 30 min following the end of co-exposure, a possible explanation may be a delay required to reach  $C_{\text{max}}$  for salicylic acid in blood. This interpretation is sustained by Cruz *et al.* (1999) results which reported a similar delay of 60 min in rat.



Finally, the *in vitro* increase of TCA levels, which was noted in human and in rat material in presence of salicylic acid, was also observed during our *in vivo* investigations, but was not statistically significant. This may be attributed to a lack of statistical power or to *in vivo* metabolic or transport mechanisms. These processes could eliminate ASA or its metabolites from the cells more efficiently than *in vitro*, hence reducing the accumulation of the drug and/or its metabolites, which could interfere with TCE biotransformation.

### 3.4.3 Valproic acid

The observed effect of valproic acid on TCE metabolism is limited to an increase of nonmetabolized TCE concentrations in blood and  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  in urine. An elevation of  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  in blood was observed, but was not statistically significant. It is more than likely that an inhibition of TCE biotransformation oxidation pathway occurs as observed *in vitro* (Cheikh Rouhou *et al.*, 2012). The increase in  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  in urine is more difficult to explain and contradictory to the inhibition of oxidation, but the increased  $\text{TCOH}_{\text{free}}$  may suggest an inhibition of glucuronidation, or an induction of aldehyde dehydrogenase. An induction of transport of TCOH glucuronide may also be an avenue to explore. It is known that at therapeutically recommended doses, oxidation is the major route for valproic acid metabolism (70 % of administrated intake) (Sztajnkrzyer, 2002) and this drug inhibits a wide variety of hepatic enzymes in humans and other animals, including cytochrome P450, UGTs, and epoxide hydrolase, as demonstrated by *in vivo* and *in vitro* investigations (Levy et Koch, 1982).

A high variability in the *in vivo* response (i.e., change in metabolite concentrations in blood) was observed among the group animals exposed to TCE combined with

valproic acid administration. The inhibition effect of this drug on TCE metabolism, as denoted by analysis results of blood, urine, and collected organs, was less pronounced for some animals than others of the same group. The observed variability, in response to TCE combined to valproic acid administration co-exposure, is possibly related to the established fluctuation in the time required to reach  $C_{\max}$  in blood for this drug. The required time to reach  $C_{\max}$  was reported by Al-Shareef *et al.* (1997) and Klotz et Antonin (1977) to vary significantly in human from 1 to 4 hours after ingestion. This variability is also supported by the work of Spiller *et al.* (2000), in which it was demonstrated that peak concentration of valproic acid can be achieved in a range of 1 hour to 18 hours, with an average of 7 to 9 hours. A similar phenomenon may exist in the rat.

Our *in vitro* results reported a decrease of TCOH in human and rat tissues. This effect was not confirmed at the microsomal level in humans, but was seen in rat. A partial non-competitive inhibition of the oxidation pathway was characterized. A more in-depth investigation is needed to understand the origins of the illustrated differences in the obtained results during *in vitro* and *in vivo* investigations.

Our present investigation proves the existence of metabolic interactions between some drugs and TCE metabolism *in vivo* in the rat. We previously published evidence of the existence of similar interactions at the *in vitro* level in human and rat tissues. We also reported similarities of the *in vitro* responses when comparing human and rat data. Based on these findings, the possibility of occurrence of such metabolic interactions in humans is very plausible and should be included in the risk assessment to human health of co-exposure to TCE and one of the identified drugs. This investigation was limited to a single time co-exposure to TCE in combination with one of the tested drugs. One can expect that similar, or more pronounced interactions, may result from multiple or chronic co-exposure. The analysis of the risk to human

health should take into account other exposure scenarios, such as repeated co-exposure, frequent or chronic drug consumption. The resulting effects of such exposure scenarios may be more pronounced, or even completely different. They are more likely, or at least more frequently, to occur in human daily life. Obviously, such co-exposure scenarios should be considered for one of the development perspectives of this investigation.

### 3.5 Conclusion

This *in vivo* investigation confirms some of the *in vitro* observations in human and rat studies, concerning toxicokinetic interactions between some medicinal drugs and TCE. Among the three considered drugs, naproxen demonstrated solid evidence of modulating TCE toxicokinetics *in vivo*. This effect should be taken into account for adequate risk evaluation and management related to TCE exposure. In the case of the other two drugs, i.e. valproic acid and salicylic acid, reported toxicokinetic interactions were less important. Nevertheless, this research should be extended to explore potential interactions resulting from chronic medication, rather a single dose intake of the concerned drugs, in order to better evaluate if chronically medicated populations have greater health risks related to TCE exposure.

### 3.6 Funding information

This work was supported by a Discovery Grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

#### 4.1 Discussion générale des résultats

L'évaluation du risque, relié à la toxicité d'une substance pour la santé humaine, commence le plus souvent par l'étude de l'effet de la dose et en particulier la détermination de la dose létale 50 (DL50). Cette approche permet d'élucider l'effet individuel de la substance étudiée, d'identifier les symptômes d'intoxication et de comparer le potentiel toxique des substances entre elles. Elle sert souvent de point de départ dans les études de toxicité ; toutefois elle présente certaines insuffisances. Entre autres, elle est incapable de prédire la toxicité des substances dont l'effet n'est détectable qu'après une phase de latence. Ainsi, cette approche doit être complétée par une étude de la toxicité chronique, afin d'évaluer les effets à long terme de la substance analysée. Ces études s'intéressent aux effets et évaluent le risque résultant d'une exposition simple à la substance analysée. Néanmoins, des problématiques d'exposition combinée à deux ou plusieurs substances sont évoquées, avec de plus en plus d'insistance depuis quelques années, par certains organismes, tel que l'IRRST (Burgess, 1995; Vyskocil *et al.*, 2001). En effet, la toxicité occasionnée par ce genre d'exposition n'est pas nécessairement l'addition des effets individuels de chacune des substances. Des interactions toxicologiques peuvent avoir lieu et affecter la toxicité observée, qui peut être supérieure ou inférieure à l'addition des effets de chacune des substances étudiées (Goldstein *et al.*, 1990; Vyskocil *et al.*, 2001). Ne pas tenir compte de ces interactions toxicologiques pourrait conduire à une sous-estimation ou



une surestimation de la toxicité réelle (Yang, 1994). Les travaux de recherche réalisés ont mis l'accent sur les interactions toxicologiques qui peuvent intervenir entre les polluants environnementaux (US Environmental Protection Agency (EPA), 1992; Yang, 1994). Ces études ont mis en évidence l'importance des interactions toxicologiques dans la modulation de la toxicité réelle, lors d'une exposition à un mélange de substances toxiques.

Néanmoins, on assiste depuis plusieurs décennies à une augmentation incessante de la consommation médicamenteuse. Celle-ci a augmenté à l'échelle mondiale d'environ 5 % passant de 370 015 millions de dollars US en 2005 à 388 281 millions de dollars US en 2006 (IMS Health, 2008). Cette augmentation n'est pas exceptionnelle, elle n'est en fait qu'une illustration de l'évolution rapide de la consommation médicamenteuse mondiale, qui perdure depuis quelques décennies. C'est ainsi que l'effet des interactions toxicologiques potentielles entre des polluants environnementaux et certains médicaments a émergé comme une source plausible de modulation du risque engendré par l'exposition à ces substances. L'effet de ces interactions toxicologiques doit être exploré pour une évaluation adéquate du risque occasionné par l'exposition combinée à ces substances.

Parmi celles-ci, le trichloréthylène (TCE), qui est un produit chimique dont l'utilisation couvre une large gamme d'applications. Plusieurs études ont mis en évidence la toxicité du TCE, ce qui a conduit à l'instauration de plusieurs limitations quant à son utilisation (ATSDR, 1997; Bogen et Gold, 1997; Viau et Tardif, 2003). Il n'en demeure que ce produit est encore présent dans plusieurs milieux et l'exposition à cette substance est assez courante. Des interactions toxicologiques entre le TCE et d'autres substances chimiques ont été mises en évidence et les effets modulateurs de ces interactions élucidés (Dobrev *et al.*, 2001; El-Masri *et al.*, 1996a; El-Masri *et al.*, 1996b; Pelekis et Krishnan, 1997; Tardif et Charest-Tardif, 1999; Tardif *et al.*, 1995;

Tardif *et al.*, 1993). Face à la consommation médicamenteuse sans cesse croissante, quelques études se sont intéressées à l'existence d'éventuelles interactions toxicologiques entre le TCE et quelques médicaments (Plewka *et al.*, 2000; Zielińska-Psujka *et al.*, 2001; Zielińska-Psujka *et al.*, 1999). Toutefois, la liste des médicaments ciblés reste très restreinte.

L'objectif de la présente étude est d'explorer l'existence d'interactions toxicologiques entre le TCE et plusieurs médicaments, couramment prescrits et consommés. Les 14 médicaments sélectionnés couvrent un large spectre de familles thérapeutiques. L'approche retenue consiste en une étude *in vitro* chez le rat et l'humain. Celle-ci comprend non seulement l'identification et la confirmation, mais aussi la caractérisation des interactions toxicologiques entre le TCE et les 14 médicaments considérés. La deuxième partie consiste en une étude *in vivo* chez le rat des interactions toxicologiques entre le TCE et quelques médicaments, préalablement choisis en se basant sur les résultats obtenus au cours de l'étude *in vitro* chez l'humain et le rat.

L'étude *in vitro* utilisant des hépatocytes humain et de rat a révélé que la biotransformation du TCE est affectée uniquement par quelques-uns des 14 médicaments considérés. Les résultats de cette étude montrent l'existence de quatre groupes de médicaments. Ceux du groupe 1 n'ont aucun effet sur la biotransformation du TCE, alors que les médicaments des groupes 2 et 3 affectent, respectivement à la hausse et à la baisse, les deux métabolites du TCE. Quant aux médicaments du groupe 4, ils n'affectent qu'un seul des deux métabolites ; le TCA ou le TCOH soit à la hausse ou à la baisse. Des similarités peuvent être identifiées en examinant les résultats *in vitro* chez l'humain et le rat. En effet, l'amoxicilline, l'ibuprofène, l'acide méfénamique et la ranitidine se retrouvent dans le groupe 1, aussi bien chez l'humain que chez le rat. Ces médicaments n'ont aucun effet sur la biotransformation *in vitro*

du TCE. Le naproxène et l'acide salicylique (groupe 2) occasionnent une augmentation des taux des deux métabolites du TCE chez les deux espèces. L'acétaminophène est le seul médicament qui figure dans le groupe 3, aussi bien chez l'humain que chez le rat. L'action des médicaments de ce groupe touche uniquement un des deux métabolites du TCE. L'effet de certains médicaments *in vitro* chez l'humain est différent de celui chez le rat. Il s'agit de la cimétidine qui ne présente aucun effet chez l'humain, mais occasionne une baisse des taux des deux métabolites du TCE chez le rat (groupe 1 et groupe 3). La carbamazépine est responsable de la baisse des taux des deux métabolites chez l'humain, mais n'a aucun effet chez le rat (groupe 3 et groupe 1). Le diclofénac, le gliclazide et l'acide valproïque affectent un seul métabolite chez l'humain, mais occasionnent des baisses des taux des deux métabolites chez le rat (groupe 4 et groupe 3). Finalement, l'érythromycine occasionne une baisse des taux des deux métabolites chez l'humain, mais dont l'action chez le rat est restreinte à un seul (groupe 3 et groupe 4).

La cimétidine est un médicament pour lequel aucun effet sur le métabolisme *in vitro* du TCE chez l'humain n'a été enregistré, mais avec lequel une baisse des niveaux des deux métabolites (TCA et TCOH) a été observée chez le rat. Ceci est conforme avec les travaux de Levine *et al.* (1998) qui rapportent que la cimétidine est un inhibiteur de plusieurs enzymes chez le rat, tels que les CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 et CYP3A4, CYP2C6 et CYP2C11. Parmi ces enzymes figurent les CYP1A2 et CYP2E1 qui sont impliqués dans la biotransformation du TCE. Ceci renforce l'hypothèse que l'effet observé résulte d'une inhibition de la voie d'oxydation. Toutefois, les baisses rapportées ne dépassent pas 25%. Elles sont assez faibles comparées aux variations enregistrées avec d'autres médicaments. Par conséquent, celui-ci n'a pas été sélectionné pour l'étape de validation avec les microsomes.

Quant au diclofénac, les résultats de l'étude *in vitro* montrent une augmentation de l'ordre de 15 % chez l'humain, en contre partie d'une baisse touchant les deux métabolites de l'ordre de 30 % chez le rat. Ces effets antagonistes pourraient être expliqués par l'existence de voies métaboliques différentes pour ce médicament chez l'humain et le rat. Sachant que le diclofénac subit une glucuronidation après son oxydation, il est plausible que ce médicament occasionne une inhibition au niveau des enzymes du CYP450 chez le rat, alors que chez l'humain, cette inhibition cible la glucuronidation du TCA ; ou alternativement, une induction touchant le CYP450 pourrait être à l'origine de l'augmentation enregistrée. Toutefois, aucune de ces hypothèses n'a été validée et aucune étude les supportant n'a été retrouvée. Bien qu'il occasionne des interactions aussi bien chez l'humain que chez le rat, ce médicament n'a pas été retenu pour l'étape de validation avec les microsomes, à cause des faibles amplitudes des modulations enregistrées.

Pour l'érythromycine, une baisse du taux de TCA a été enregistrée aussi bien chez l'humain que chez le rat avec des amplitudes similaires, d'environ 20 %. Toutefois, chez l'humain uniquement, une baisse, également de l'ordre de 20 % touchant le taux de TCOH, a aussi été observée. Ces baisses pourraient être expliquées chez les deux espèces par une inhibition des enzymes du CYP450; l'érythromycine étant métabolisé par les enzymes du cytochrome P450 et en particulier par les isoenzymes de la superfamille CYP3A (Hunt *et al.*, 1992).

Les médicaments présentant les interactions les plus prononcées avec le TCE ont été retenus pour validation en utilisant les microsomes. Les interactions validées ont été caractérisées et les constantes d'inhibition déterminées. Quatre médicaments (l'acide salicylique, le naproxène, l'acétaminophène et l'acide valproïque) sont communs aux deux espèces. Cette liste est complétée par un autre médicament ; il s'agit de la carbamazépine chez l'humain et du gliclazide chez le rat. Aussi bien chez l'humain

que chez le rat, la validation des interactions identifiées avec les hépatocytes a été négative pour l'acide salicylique et l'acétaminophène. Ceci indique que les interactions observées au niveau des hépatocytes ne sont pas le résultat d'une action directe sur le système enzymatique impliqué dans la biotransformation du TCE.

Le gliclazide et la carbamazépine sont les deux médicaments dont les effets ont montré le plus de divergences entre l'humain et le rat. En effet, le premier médicament reste sans effet sur la biotransformation du TCE chez l'humain, mais agit sur les enzymes du CYP450 par inhibition non compétitive partielle, qui se manifeste par une baisse des taux de TCOH, tel que montré par les résultats de validation et de caractérisation chez le rat. Quant au deuxième médicament dont l'interaction a été validée et caractérisée chez l'humain, il agit par une inhibition non compétitive de la formation du TCOH, alors qu'il reste sans effet chez le rat.

L'acide valproïque a occasionné des interactions métaboliques aussi bien chez l'humain que chez le rat. Celles-ci ont été positivement validées avec les microsomes puis caractérisées chez le rat. Les résultats montrent que ce médicament inhibe la formation du TCOH et du TCA, avec un taux de 50 % par rapport au contrôle chez le rat. Chez l'humain, l'effet enregistré est de même amplitude, mais ne touchant que le TCOH. Ceci montre qu'il y a bel et bien une similitude dans les mécanismes d'action de l'acide valproïque sur le métabolisme du TCE chez l'humain et le rat. Toutefois, des différences existent entre les deux espèces. Elles doivent être explorées de façon plus approfondie et prises en considération lors de l'extrapolation du rat vers l'humain.

Quant au naproxène, ses interactions avec la biotransformation du TCE ont été positivement validées en utilisant les microsomes puis caractérisées. L'exploration révèle une inhibition compétitive de la voie de glucuronidation chez l'humain et

compétitive partielle chez le rat. Toutefois, les valeurs des constantes d'inhibition  $K_i$  ne sont pas dans le même ordre de grandeur comparées au  $C_{\max}$ . En effet, la constante d'inhibition est du même ordre de grandeur que le  $C_{\max}$  chez le rat et de 10  $C_{\max}$  chez l'humain.

L'étude *in vitro* chez l'humain et le rat a apporté des résultats très intéressants, en confirmant l'existence d'interactions toxicologiques entre certains médicaments et le TCE. Toutefois, cette étude *in vitro* ne reproduit pas tous les processus biologiques impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques. Elle demeure donc insuffisante pour une évaluation adéquate du risque engendré par l'exposition simultanée au TCE et l'un des médicaments considérés dans cette étude.

Les hépatocytes sont un choix judicieux pour l'étude *in vitro* des interactions entre le TCE et les médicaments considérés. En effet, les hépatocytes, quand elles sont fraîchement isolées, renferment la plupart des enzymes de phase 1 et 2 avec des niveaux qui miment la composition *in vivo*. Elles permettent l'étude globale du métabolisme de plusieurs xénobiotiques, ainsi que les interactions entre plusieurs substances. Toutefois, le niveau d'expression des enzymes baisse rapidement après 3h. De plus, les hépatocytes en suspension ne permettent pas de tenir compte de la quantité éliminée par la bile, ni d'étudier les interactions intercellulaires, ou de conserver l'anatomie des cellules (Li, 2007). Malgré ces limitations, l'utilisation des hépatocytes nous a permis de faire un premier criblage des interactions entre le TCE et les 14 médicaments considérés et cibler celles qui représentent un potentiel élevé de se reproduire *in vivo*.

Pour la caractérisation, le choix s'oriente évidemment vers les fractions subcellulaires et plus spécifiquement les microsomes. L'utilisation de ces derniers permet de mieux identifier et distinguer les mécanismes impliqués dans la biotransformation d'un



xénobiotique. De plus, il est possible d'investiguer un seul processus de biotransformation à la fois en sélectionnant le cofacteur approprié. Toutefois, il est nécessaire de prendre en considération que les concentrations des enzymes présents dans les microsomes sont plus élevées qu'*in vivo*.

D'autre part, les faux positifs ou en d'autres termes les artefacts expérimentaux, ne peuvent pas être totalement exclus et la probabilité de leur existence est inhérente aux études *in vitro*. L'approche adoptée est donc complétée par une étude *in vivo* chez le rat. Trois médicaments ont été sélectionnés en se basant sur l'amplitude de leurs interactions avec la biotransformation du TCE *in vitro* chez l'humain et le rat et leurs similitudes. Les médicaments retenus pour cette étude *in vivo* sont l'acide salicylique, l'acide valproïque et le naproxène.

Une description détaillée du matériel et méthodes utilisés dans l'étude *in vivo* est donnée dans le troisième article (chapitre III). La discussion passera en revue rapide les principaux résultats et sera axée sur des interprétations n'ayant pas été traitées dans cet article.

Les résultats d'analyse de sang et d'urine, ainsi que des tissus prélevés (foie, poumons et reins) montrent que les effets observés varient grandement selon le médicament concerné.

Pour l'acide salicylique, des augmentations de 25 % du  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  à 30, 60 et 90 min dans le sang après la fin de l'exposition, ainsi que de 10% dans l'urine ont été rapportés. Ces effets ont été observés, principalement, entre 30 et 90 min suivant l'administration du médicament. Ce qui est conforme avec le  $T_{\text{max}}$  (temps nécessaire au médicament pour atteindre la concentration maximale dans le sang après

administration d'une dose thérapeutique) qui est de l'ordre de 1 h. Une augmentation du  $\text{TCOH}_{\text{libre}}$  de 20 % dans le sang à 90 min après la fin de l'exposition a aussi été mesurée. Aucune autre action affectant le TCE et ses métabolites dans le sang, l'urine et les tissus prélevés n'a été détectée. Ce résultat concorde avec ceux de l'étude *in vitro* chez l'humain et le rat. Les interactions ont été positivement identifiées chez les deux espèces, mais la validation a été négative en utilisant les microsomes.

Quant à l'acide valproïque, les résultats montrent une augmentation du TCE non métabolisé à 30 et 120 min après la fin de l'exposition, ainsi que du TCA à 1080 min, dans le sang. Rappelons qu'*in vitro* les interactions identifiées ont été validées et caractérisées uniquement chez le rat. Les résultats ont mis en évidence une inhibition non compétitive qui touche la formation du  $\text{TCOH}$  et du TCA. Chez l'humain, une inhibition affectant la formation du  $\text{TCOH}$  a été identifiée, mais sa validation en utilisant les microsomes s'est avérée négative. Ceci explique l'augmentation du TCE non métabolisé observée *in vivo*.

Une variabilité dans la réponse des rats testés a été notée. Celle-ci est pourrait être due à la grande variabilité démontrée dans le temps nécessaire à l'acide valproïque pour atteindre sa concentration maximale sanguine. Selon la littérature, ce temps, chez l'humain varie de 1 h à 4 h selon les travaux de Silva *et al.* (2008) et de 1 h à 18 h avec une moyenne de 7 h selon ceux de Spiller *et al.* (2000). La présence de nourriture ou non dans l'estomac en est l'un des principaux facteurs. Rappelons que les rats avaient accès libre à la nourriture avant le début de l'exposition.

Le naproxène est le 3<sup>ème</sup> médicament qui a été analysé dans l'étude *in vivo*. Il est celui qui a occasionné le plus d'interactions, tel que révélé par les effets notés dans le sang, l'urine et le foie. Les résultats montrent une augmentation des taux du  $\text{TCOH}_{\text{libre}}$  à 30, 60 et 90 min après la fin d'exposition et du  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  en tout temps, dans le sang.

Quant au TCA, une diminution a été mesurée dans l'urine, ainsi qu'une augmentation dans le foie et dans le sang à 90 min après la fin d'exposition. L'inhibition compétitive chez l'humain et compétitive partielle chez le rat de la voie de glucuronidation, tel qu'élucidé dans l'étude *in vitro*, serait à l'origine de l'augmentation des taux de  $\text{TCOH}_{\text{libre}}$  et  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  dans le sang et qui se répercute aussi en une augmentation du taux TCA dans le foie. Les effets observés ont débuté une heure et demi après administration du médicament, c'est-à-dire avant même que celui-ci n'atteigne sa concentration maximale dans le sang. Des effets modulateurs plus prononcés auraient été observés si des prélèvements avaient été effectués après 3 h de l'administration de la dose médicamenteuse ; sachant que le  $T_{\text{max}}$  du naproxène varie de 2 à 4 h.

L'étude *in vitro* chez l'humain et le rat a apporté des résultats originaux et innovateurs. Il s'agit de la première étude de criblage qui a ciblé une aussi vaste gamme de médicaments appartenant à un aussi large spectre de familles thérapeutiques. Ceci a permis de diriger l'attention vers trois médicaments qui ont montré le plus fort potentiel d'interactions toxicologiques avec la biotransformation du TCE et présentant un profil de réponses similaires chez l'humain et le rat. Rappelons que l'absence ou le faible potentiel d'interactions pour certains médicaments est en soit un résultat très intéressant.

Bien que plusieurs similarités dans l'effet des médicaments sur la biotransformation du TCE aient été observées dans l'étude *in vitro*, des différences ont aussi été constatées entre le rat et l'humain. Ces différences peuvent trouver leur explication principalement dans les divergences métaboliques de la biotransformation des médicaments considérés entre les deux espèces, ainsi que dans le niveau d'expression inégal des enzymes impliqués dans la biotransformation du TCE chez l'humain et le rat. Le CYP2E1 est relativement bien conservé au sein des différentes espèces, ce qui

n'est nécessairement pas le cas pour plusieurs autres enzymes impliqués dans le métabolisme du TCE (UGT, ADH, etc.). De telles différences génétiques auront un effet sur l'affinité de ces enzymes aux métabolites du TCE et des médicaments. Ce qui expliquerait certaines différences observées entre le rat et l'humain.

Afin d'évaluer les interactions qui ont été identifiées et de prédire la probabilité qu'elles se reproduisent *in vivo* lors de l'administration d'une dose thérapeutique, la caractérisation est une étape importante qui permet de définir le type d'inhibition et de déterminer les valeurs de  $K_i$ . Plus les valeurs de  $K_i$  obtenus sont proches de la concentration maximale sanguine après une dose thérapeutique, plus la probabilité que de telles interactions métaboliques se produisent *in vivo* est élevée. Des simulations préliminaires à l'aide d'un modèle PBPK du TCE ont été réalisées pour une population exposée au TCE à des concentrations environnementales et au naproxène ou à la carbamazépine à des concentrations sanguines suite à une dose thérapeutique. Les calculs montrent que le taux de formation de TCOG en présence du naproxène à des concentrations thérapeutiques maximales est réduit d'environ 50% par rapport à une exposition simple au TCE. Une conséquence de cette réduction de la formation de TCOG serait une augmentation du TCOH dans le sang et par conséquent du TCA dans les tissus. Ceci aurait pour effet une augmentation des risques de toxicité. Alors que pour la carbamazépine, le taux de formation de TCOH n'a été affecté que par une légère diminution d'environ 10% par rapport à une exposition simple au TCE. Cette faible diminution du TCOH pourrait conduire à des niveaux de TCA dans les tissus légèrement inférieurs. Il est donc peu probable que l'impact observée soit significatif sur le risque de toxicité.

L'étude *in vivo* a, quant à elle, apporté des résultats très importants concernant le potentiel d'interactions toxicologiques entre chacun des trois médicaments et la biotransformation du TCE. Ces résultats apportent des éléments de réponse

concernant le risque occasionné par l'exposition simultanée au TCE et aux médicaments analysés. En particulier pour le naproxène dont l'étude *in vivo* a révélé une augmentation des taux de  $\text{TCOH}_{\text{libre}}$  et  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  dans le sang et du TCA dans le foie. L'élimination du TCA dans le foie est lente; sa demi-vie est de l'ordre de 52 h puisque cette substance se lie fortement aux protéines plasmatique avec un pourcentage qui varie entre 86 % et 90 % (Muller *et al.*, 1972). Les travaux de Ge *et al.* (2001) rapportent que le TCA induit une hypométhylation de l'ADN et une prolifération des péroxysomes et des cellules, provoquant ainsi le cancer du foie. L'exploration des interactions toxicologiques entre le naproxène et le TCE doit donc être complétée pour une évaluation du risque occasionné à la santé humaine et les mesures nécessaire pour l'atténuer ou l'éliminer.

L'utilisation du rat comme modèle de l'étude *in vivo* est l'un des choix les plus judicieux, qui a été en mesure d'apporter des éléments de réponses concernant la biotransformation du TCE dans un contexte de consommation médicamenteuse (de l'administration jusqu'à l'élimination). Toutefois, les mécanismes impliqués chez le rat, présentent certaines différences comparées à ceux chez l'humain. Ceci encadre et érige les limites de l'extrapolation des résultats obtenus du rat vers l'humain.

#### 4.2 Perspectives de développement

L'étude chez l'humain (*in vitro*) ainsi que chez le rat (*in vitro-in vivo*) a montré que parmi les 14 médicaments à consommation courante considérés, quelques uns sont capables de moduler la biotransformation du TCE. Les plus fortes, parmi les interactions identifiées, ont été validées et caractérisées, aussi bien chez l'humain que le rat. De plus, trois médicaments ont été sélectionnés pour la force de leurs réponses et les similarités de leurs profils chez l'humain et le rat pour l'étude *in vivo*. Comme



pour toute approche, celle-ci présente certaines limitations dont il faut tenir compte dans la mise en application ou l'interprétation des résultats de cette étude. Ces limitations sont aussi une précieuse source de perspectives de développement pour ce travail de recherche. Trois principales perspectives de développement ont été identifiées et jugées importantes. Elles sont discutées dans cette section.

L'approche *in vitro* chez l'humain et le rat n'a pas pris en considération les liaisons protéiques établis par les médicaments considérés et le TCA (métabolite du TCE) et dont l'existence a déjà été démontrée. D'autre part, les résultats obtenus par l'approche adoptée, notamment ceux de l'étude *in vivo*, nécessitent une extrapolation vers l'humain, dans une perspective de réévaluation du risque d'exposition au TCE dans un contexte de consommation simultanée de l'un des médicaments de cette étude. Le développement d'un modèle pharmacocinétique à base physiologique PBPK qui prend en considération les interactions identifiées, serait une perspective de développement intéressante de cette étude. Finalement, les résultats obtenus le sont pour une co-exposition unique. L'étude des effets lors d'expositions sub-chroniques ou chroniques constitue une autre perspective de développement de ce travail, présentant un intérêt particulier dans le processus global d'évaluation du risque pour la santé humaine.

#### 4.2.1 Les liaisons protéiques

Toute substance présente dans le sang, comporte une fraction libre active et une fraction liée aux protéines plasmatiques. Le déplacement, par exemple par l'action d'une autre substance, d'une partie ou de la totalité de la fraction liée aux protéines plasmatiques modifie la proportion libre et donc active dans le sang. L'albumine est la protéine la plus abondante dans le plasma sanguin (Fichtl *et al.*, 1991; Meijer et



Van der Sluijs, 1989; Wright *et al.*, 1996). Une de ses principales fonctions est d'assurer le transport des composées endogènes et exogènes. Lorsqu'elles sont libres, ces substances peuvent être actives (du point de vue pharmacologique ou toxicologique) et demeurent inactives lorsque elles sont liées à l'albumine (Kragh-Hansen, 1990; Vorum, 1999). Mais cette inactivité n'est que temporaire puisqu'il s'agit un équilibre réversible entre les fractions libres et liées. La fraction libre d'une substance dans le sang peut être déterminée par l'équation suivante :

$$f_l = \frac{C_{\text{libre}}}{C_{\text{libre}} + C_{\text{lié}}}} = \frac{K_d + C_{\text{libre}}}{B_{\text{max}} + K_d + C_{\text{libre}}} \quad (4.1)$$

où  $f_l$  désigne la fraction libre,  $C_{\text{libre}}$  est la concentration libre,  $C_{\text{liée}}$  est la concentration liée,  $K_d$  est la constante de dissociation et  $B_{\text{max}}$  représente la valeur maximale de liaison non-spécifique.

Seule la fraction libre est disponible pour distribution dans les différents organes et plus spécifiquement dans le foie ; lieu principal de biotransformation des substances. Les variations de la concentration libre, en raison du déplacement des liaisons protéiques par compétition sur les sites de fixation, peuvent augmenter l'effet de la substance, en particulier si celle-ci présente un taux élevé de liaison à l'albumine. Cette substance peut être un polluant, un médicament ou un des métabolites de ces produits. Cependant, les études explorant l'effet des liaisons plasmatiques sur l'action des contaminants et polluants de l'environnement sont limitées. D'autre part, plusieurs des médicaments considérés dans cette étude présentent un taux élevé de liaisons protéiques. Une compétition pour l'établissement de ce genre de liaison pourrait donc avoir lieu lors d'une co-exposition TCE-médicament. Ceci explique

l'importance de la prise en considération des liaisons protéiques dans l'évaluation de l'effet de la consommation médicamenteuse sur la biotransformation du TCE.

Parmi les médicaments de cette étude, le naproxène est l'un de ceux qui ont occasionné de fortes interactions toxicocinétiques *in vitro* chez l'humain et le rat. Ce médicament est un AINS que se lie fortement aux protéines plasmatiques et en particulier à l'albumine, avec un taux supérieur à 99% (<http://www.drugs.com/pro/naproxen.html>). L'interaction du naproxène avec la cinétique du TCE se manifeste par un accroissement des niveaux des métabolites de celui-ci. Le TCOH, qui est le métabolite principal du TCE, n'est pas connu pour être un produit très toxique, même s'il présente plusieurs effets secondaires, tels qu'un manque de vitamine B12 et une altération du métabolisme folique. De plus, aucune étude antérieure n'a mis en évidence sa liaison avec les protéines plasmatiques. Par contre ce n'est pas le cas pour le TCA, qui est le deuxième métabolite du TCE, aussi bien chez l'être humain que chez le rat (Forkert *et al.*, 2003; Monster, 1979). En effet, les travaux de Ge *et al.* (2001) supportent que le TCA induit une hypométhylation de l'ADN et une prolifération des péroxysomes et des cellules, provoquant ainsi le cancer du foie. De plus, les travaux de Muller *et al.* (1972) démontrent que le TCA se lie fortement aux protéines plasmatiques, avec un pourcentage qui varie entre 86 % et 90 %. Ce taux élevé de liaisons protéiques est la cause de la longue demi-vie du TCA, qui est de l'ordre de 52 h (Muller *et al.*, 1972).

L'hypothèse que les liaisons protéiques peuvent altérer la modulation de la biotransformation, ou de la cinétique du TCE et de ses métabolites par le naproxène, lors d'une co-exposition TCE-médicament est donc plausible et devrait être envisagée. Si confirmée, cette compétition entre le naproxène et le TCA à établir des liaisons protéiques peut occasionner des conséquences non négligeables. En effet, le naproxène en cherchant à établir des liaisons protéiques avec l'albumine pourrait

entraîner un déplacement du TCA de ses sites de fixation ; déclenchant ainsi une augmentation de la fraction libre du TCA dans le sang. Ce déplacement pourrait donc avoir comme impact un accroissement de la durée et/ou de la concentration interne à laquelle les tissus cibles et plus spécifiquement le foie sont exposés.

En supposant que la constante d'inhibition ( $K_i$ ) du naproxène a la même valeur que la constante de dissociation ( $K_d$ ), il est possible d'estimer la relation entre les fractions libre et liée du TCA dans le sang par l'équation suivante :

$$C_{\text{liée}} = \frac{B_{\text{max}} \times C_{\text{libre}}}{K_d \left( 1 + \frac{C_i}{K_i} \right) + C_{\text{libre}}} \quad (4.2)$$

où  $C_{\text{liée}}$  désigne la concentration liée,  $B_{\text{max}}$  est la valeur maximale de liaison non-spécifique,  $C_{\text{libre}}$  est la concentration libre,  $K_d$  est la constante de dissociation,  $C_i$  est la concentration de l'inhibiteur et  $K_i$  représente la constante d'inhibition.

Il est tout à fait plausible que cette augmentation de la dose d'exposition interne du TCA, qui affecte les organes cibles et en particulier le foie, pourrait décupler la probabilité d'induire le cancer. Ces effets pourraient être plus prononcés chez l'humain que chez les rongeurs. En effet, les travaux de Lumpkin (2002) confirment que le taux de liaisons plasmatiques du TCA est plus élevé chez l'humain que chez les rats et les souris. D'autant plus que le taux de formation du TCA est environ 10 fois supérieur chez l'humain que chez le rat.

Des études complémentaires sont donc nécessaires pour élucider l'effet des liaisons protéiques sur la modulation de la biotransformation du trichloréthylène par les médicaments dont l'action a été établie par ce travail de recherche.

#### 4.2.2 Modélisation PBPK

Cette étude s'inscrit dans une perspective d'évaluation du risque pour la santé humaine occasionné par une exposition simultanée au TCE et l'un des médicaments de ce travail de recherche. L'étude *in vitro* chez l'humain et le rat a permis d'identifier, valider et caractériser les interactions entre le TCE et les médicaments considérés, ainsi que de comparer les profils d'interaction chez les deux espèces. Les conclusions des études *in vitro* ainsi qu'*in vivo* ne sont pas immédiatement exploitables pour une réévaluation du risque chez l'humain. Une extrapolation des résultats de cette exploration est encore nécessaire.

Ce besoin peut être comblé par la modélisation toxicocinétique à base physiologique (PBPK ou TCBP). Cette approche de modélisation consiste à décrire mathématiquement les mécanismes d'absorption, de biotransformation, de distribution et d'excrétion des substances chimiques (Krishnan *et al.*, 1994a). Les modèles PBPK tiennent compte de la physiologie de l'organisme, ainsi que des caractéristiques physicochimiques des xénobiotiques (Clewell et Andersen, 1985, 1989).

Les modèles TCBP considèrent l'organisme comme un ensemble de compartiments représentant des organes ou des regroupements d'organes. Ces compartiments sont inter-reliés par la circulation sanguine. Le transport des substances est décrit par un système d'équations différentielles dans lesquelles interviennent principalement la

quantité ou la concentration des substances dans les différents organes, le flux sanguin, le volume des organes et les coefficients de partage, ou encore le taux de ventilation.

(Beck *et al.*, 1993; Clewell et Andersen, 1985; Clewell et Jarnot, 1994; D'Souza et Boxenbaum, 1988; Frederick, 1993; Gerlowski et Jain, 1983; Haddad *et al.*, 2000; Leung, 1991). D'autre part, les modèles PBPK permettent l'estimation de la fraction biologiquement effective (par exemple la quantité métabolisée ou la concentration libre dans l'organe cible) de la dose absorbée (quantité administrée) (Clewell, 1993; Dankovic et Bailer, 1994).

Les modèles pharmacocinétiques à base physiologiques (PBPK) du TCE et ses métabolites et du naproxène permettent, chacun de son côté, de simuler l'évolution temporelle des concentrations de ces substances dans l'organisme. Il est nécessaire de lier ces deux modèles, en incorporant les équations mathématiques qui décrivent les interactions toxicologiques entre le TCE et le naproxène, qui ont été établies lors de l'étude *in vitro* chez le rat. Le nouveau modèle PBPK ainsi établi prend en considération les interactions toxicologiques qui ont été identifiés, validés et caractérisés dans cette étude. Il peut être validé de façon globale en ayant recours aux résultats obtenus dans l'étude *in vivo* chez le rat. Néanmoins, des données complémentaires, concernant l'évolution temporelle des concentrations du TCE et de ses métabolites dans l'urine et les autres organes, doivent être obtenues par des expériences supplémentaires *in vivo* chez le rat. Ces données permettront une validation détaillée du modèle PBPK établis. Rappelons que dans le cadre de cette étude, seule l'évolution temporelle dans le sang a fait l'objet de suivi. L'analyse du TCE et de ses métabolites dans l'urine et les organes prélevés a été réalisée uniquement après la fin d'exposition.

Une fois validé chez le rat, le modèle PBPK établi devient alors un outil de simulation qui rend possible de transposer à l'humain les résultats obtenus chez l'animal (Watanabe et Bois, 1996; Welsch *et al.*, 1995). Pour cette extrapolation, les valeurs des paramètres chez l'animal sont remplacées par leurs correspondants chez l'humain. Il s'agit non seulement des paramètres physiologiques, mais aussi ceux relatifs au naproxène ainsi qu'au TCE et ses métabolites, qui interviennent dans la description mathématique des interactions toxicologiques (Gelman *et al.*, 1996).

L'effet potentiellement important que pourraient engendrer les liaisons protéiques plasmatiques du naproxène et du TCA a été précédemment illustré. Il serait intéressant de l'incorporer dans le modèle PBPK permettant l'extrapolation vers l'humain des résultats obtenus chez le rat. L'objectif visé serait d'améliorer la précision du modèle PBPK. Une fois amélioré, ce modèle prendrait en considération l'effet des interactions toxicologiques y compris celui des liaisons protéiques.

L'utilisation de ce modèle permettrait de simuler des scénarios d'exposition simultanée au TCE et au naproxène, tout en prenant en considération l'effet des interactions toxicologiques incluant celui de liaisons protéiques engendrées par ce médicament, sur la biotransformation du TCE chez l'humain. En particulier, l'impact de la prise du médicament sur les concentrations du TCE et de ses métabolites dans les tissus cibles pourrait être évalué. La variation temporelle de l'exposition interne des tissus cibles, ainsi que sa fluctuation pour différentes doses du médicament sont des exemples des nombreuses données qui peuvent être simulées chez l'humain. Ceci permettrait une compréhension plus approfondie des mécanismes et effets des interactions, mais aussi une meilleure évaluation et gestion du risque chez l'humain. Entre autres, par la détermination de la posologie minimale du médicament qui entraîne une interaction toxicologique avec le TCE, ou l'établissement de nouvelles



limites d'exposition professionnelle (OEL : Occupational Exposure Limits) pour des sous-populations chroniquement médicamenteuses.

Il est intéressant de souligner que le TCE fait partie d'une famille de composés organiques volatiles (COV) avec lesquels il partage plusieurs similarités, en particulier concernant les voies de biotransformation de ces substances. Parmi ces COV, le tétrachloréthylène, le toluène et le trichloréthane. Des travaux de recherche ont même mis en évidence l'existence d'interactions toxicologiques entre le TCE et certaines de ces substances. À la lumière des interactions toxicologiques dont l'existence a été établie par cette étude entre le TCE et certains médicaments (en particulier le naproxène) et des similarités entre le trichloréthylène et d'autres COV, il est pertinent de se questionner si ce médicament n'affecte pas de manière similaire la biotransformation d'autres composés organiques volatils et donc leur toxicité.

#### 4.2.3 Effet de la co-exposition chronique aux médicaments et au TCE

La croissance soutenue de la consommation médicamenteuse dans le monde multiplie les possibilités d'une exposition simultanée polluant-médicament et en particulier au TCE en combinaison avec l'un des 14 médicaments de cette étude. À cette augmentation s'ajoute un accroissement de la durée et/ou de la fréquence des traitements. D'autre part, l'exposition au TCE peut avoir lieu de façon répétée et/ou fréquente. Des co-expositions répétées, de longue durée ou chroniques s'imposent donc comme des scénarios plausibles qu'il faudra considérer et en évaluer les conséquences.

La présente étude avec ses volets *in vitro* et *in vivo* a permis l'identification, la validation et la caractérisation des interactions toxicocinétiques, entre le TCE et les 14 médicaments considérés, suite à une co-exposition unique ou en d'autres termes

une seule dose. Les résultats obtenus montrent que la biotransformation du TCE est affectée par certains médicaments seulement. Pour les autres, aucun effet significatif n'a été enregistré, suite à une co-exposition unique à la combinaison polluant-médicament. Il serait intéressant de comparer pour chacun de ces 14 médicaments si l'effet observé changerait dans le cas d'une co-exposition répétée, de longue durée ou chronique. Contrairement à l'inhibition dont l'effet se manifeste presque immédiatement, l'induction nécessite une phase de latence qui peut varier d'une heure à 21 jours, dépendamment de l'inducteur, avant que son action ne devienne significative. D'autre part et de façon similaire, l'arrêt de l'exposition à l'inducteur ne signifie pas un arrêt immédiat de son effet (Mura, 2011).

L'induction du système enzymatique peut affecter la biotransformation d'un produit chimique de façon qualitative et/ou quantitative. De façon générale, l'induction d'une voie métabolique engendre une atténuation des effets attendus du produit-mère. En effet, une substance peut augmenter l'expression des gènes qui codent pour plusieurs enzymes et spécifiquement ceux du CYP450 ; induisant ainsi une augmentation de leurs activités métaboliques. Des enzymes du CYP450 peuvent être impliqués dans la biotransformation du produit inducteur, ou dans le métabolisme d'autres produits. Cette modulation de l'activité des enzymes du CYP450 engendrerait un accroissement des métabolites, qui sont généralement plus actifs et présentant probablement un taux de liaison plus élevé avec plusieurs molécules cibles. Généralement, les métabolites deviennent ainsi plus toxiques que le produit-mère. De plus, avant d'être éliminés, certains composés subissent une deuxième série de biotransformation dont les produits résultants sont généralement moins actifs et moins toxiques. Au cours de ces réactions de détoxification, une carence des cofacteurs peut aussi se produire suite à l'augmentation des métabolites actifs. Ceci aurait pour conséquences un accroissement des effets toxiques dans les organes cibles à cause d'une accumulation des métabolites toxiques par manque de cofacteurs.

L'analyse du risque pour la santé humaine doit tenir compte, en plus des perspectives de développement discutées précédemment, de l'effet d'une co-exposition répétée, fréquente ou chronique à la combinaison polluant-médicament. Ce type d'exposition est fréquent dans la population et son étude pourrait révéler d'autres interactions susceptibles de moduler la toxicocinétique du TCE. La présente étude, de part son approche (exposition *in vivo* simple de courte durée et étude *in vitro*), n'a pas pu aborder la problématique sous cet angle.

Finalement, il est intéressant de noter que l'étude des interactions, au niveau toxicocinétique et toxicodynamique, pourrait être aussi envisagée pour une exposition combinée au polluant et un mélange de médicaments. Une multitude de combinaisons de substances sont possibles ; ceux qui présentent des indices indiquant des interactions toxicologiques potentielles, telles que des voies métaboliques communes, devraient être les premières ciblées.

#### 4.2.4 Impact sur la biosurveillance

La gestion de l'exposition au trichloréthylène est assurée entre autres par la mise en place par des organismes spécialisés de doses limites, tels que les OEL (Occupational Exposure Limits) (ATSDR, 1997; Santé Canada 2004; US Environmental Protection Agency (EPA), 2001). Cette mesure offre l'avantage de cibler la source d'exposition. Il s'agit d'une mesure préventive qui permet d'éviter une exposition supérieure aux limites acceptables, mais dont l'application n'est toujours facile ou possible. La biosurveillance vient donc s'ajouter comme mesure complémentaire, mais post exposition qui s'intéresse aux conséquences et effets occasionnés. Cette mesure utilise des biomarqueurs pour établir une corrélation entre l'exposition au TCE et la

présence de cette substance et/ou ses métabolites dans le corps humain, notamment le sang et l'urine. Pour le TCE, les concentrations du TCOH dans le sang et du TCA dans l'urine et le sang (Imbriani *et al.*, 2001; Monster et Smolders, 1984) sont utilisées dans la biosurveillance de l'exposition au TCE. Le TCA ayant une demi-vie beaucoup plus longue fournit des informations sur l'exposition moyenne ayant lieu la semaine précédant le prélèvement, alors le TCOH permet le suivi des expositions plus récentes (ATSDR, 1997).

La présente étude a mis en évidence l'effet modulateur de certains médicaments sur la biotransformation du TCE. Les interactions identifiées modifient les concentrations du TCOH et du TCA dans le sang et/ou dans l'urine. Pour une gestion adéquate du risque occasionné par l'exposition au TCE dans un contexte de consommation médicamenteuse, les doses limites devraient être réévaluées pour tenir compte des interactions toxicologiques. Quant à la biosurveillance, elle devrait être adaptée pour prendre en considération la modulation de la biotransformation du TCE, occasionnée par ces interactions et ses effets sur les concentrations du TCOH et du TCA. Ne pas tenir compte de ces effets modulateurs occasionnés par certains médicaments, pourrait entraîner une sous-estimation ou une sur-estimation de la dose d'exposition au TCE, déterminée lors de la biosurveillance.

## CHAPITRE V

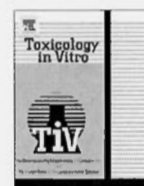
### CONCLUSION GÉNÉRALE

Cette étude a exploré les interactions toxicologiques entre le TCE et 14 médicaments à consommation courante. Les résultats des volets *in vitro* chez l'humain et le rat ont révélé que la biotransformation du TCE est affectée uniquement par certains médicaments. Les interactions les plus prononcées ont été validées et caractérisées pour l'humain, mais aussi chez le rat. La comparaison des profils de réponse chez les deux espèces montre une concordance globale des résultats *in vitro*. Le naproxène, l'acide valproïque et l'acide salicylique ont été sélectionnés pour l'étude *in vivo* chez le rat, pour la force des interactions occasionnées et les similarités des profils chez les deux espèces. L'analyse du sang, de l'urine et des tissus prélevés dans l'étude *in vivo* chez le rat a mis en évidence des effets limités pour l'acide salicylique et l'acide valproïque. Le premier a occasionné uniquement une augmentation du  $\text{TCOH}_{\text{libre}}$  et du  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  dans le sang. Quant au deuxième, une augmentation du TCE non métabolisé et du TCA dans le sang et du  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  dans l'urine ont été enregistrés. Le naproxène est le médicament qui a occasionné le plus d'effets, qui se sont manifestés par une augmentation du  $\text{TCOH}_{\text{libre}}$  dans le sang, du  $\text{TCOH}_{\text{total}}$  dans le sang et dans l'urine, une baisse du TCA dans l'urine, ainsi qu'une augmentation du TCA dans le foie. Ces effets résulteraient d'une inhibition de la voie de glucuronidation, dont la caractérisation *in vitro* a révélé qu'elle est compétitive chez l'humain et compétitive partielle chez le rat.

Cette étude a apporté des résultats importants et innovateurs, qui amènent des éléments de réponse concernant le risque pour la santé humaine occasionné par une exposition simultanée au TCE et l'un des 14 médicaments considérés. Toutefois, pour être exploitables pour l'humain, les résultats obtenus doivent être extrapolés pour celui-ci, à travers l'établissement d'un modèle PBPK qui prend en considération les interactions révélées dans cette étude. Il est aussi recommandé, comme autres perspectives de développement de cette recherche, d'explorer les effets potentiels des liaisons protéiques et d'une co-exposition répétée, fréquente ou chronique.



## APPENDICE A



## Modulation of trichloroethylene *in vitro* metabolism by different drugs in rats

Mouna Cheikh Rouhou<sup>a</sup>, Isabelle Rheault<sup>a</sup>, Sami Haddad<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>TOXEN, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888 Succ. Centre-ville, Montreal, Canada H3C 3P8

<sup>b</sup>Département de Santé Environnementale et Santé au Travail, Chaire d'analyse et de gestion des risques toxicologiques, IRSPUM, Faculté de Médecine, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montreal, Canada H3C 3J7

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 May 2012

Accepted 8 October 2012

Available online 23 October 2012

#### Keywords:

Trichloroethylene  
Metabolism  
Interactions  
Inhibition  
Rat liver microsomes  
Rat hepatocytes  
Metabolic clearance  
Trichloroethanol  
Trichloroacetate  
Drugs  
Pharmaceuticals

### ABSTRACT

Trichloroethylene (TCE) is a widely used chemical to which humans are frequently exposed. Toxicological interactions with drugs are among factors having the potential to modulate the toxicity of TCE. The aim of this study was to identify metabolic interactions between TCE and 14 widely used drugs in rat suspended hepatocytes and characterize the strongest using microsomal assays (oxidation and/or glucuronidation). The concentrations of TCE and its metabolites, trichloroethanol (TCOH) and trichloroacetate (TCA), were measured by gas chromatography with injection headspace coupled to mass spectrometry (GC–MS). Results in hepatocyte incubations show that selected drugs can be segregated into four groups: group 1: drugs causing no significant interactions (five drugs: amoxicillin, carbamazepine, ibuprofen, mefenamic acid and ranitidine); group 2: increasing both TCE metabolites (two drugs: naproxen and salicylic acid); group 3: decreasing both TCE metabolites (five drugs: acetaminophen, glyclazide, valproic acid, cimetidine and diclofenac) and group 4: affecting only one (two drugs: erythromycin and sulphasalazine). Naproxen and salicylic acid (group 2) and acetaminophen, glyclazide and valproic acid (from group 3) presented the strongest interactions (i.e. drugs changing metabolite levels by 50% or more). For group 2 drugs, characterization in rat microsomes confirmed interaction with naproxen only, which was found to partially competitively inhibit TCOH glucuronidation ( $K_i = 211.6 \mu\text{M}$ ). For group 3 selected drugs, confirmation was positive only for glyclazide ( $K_i = 58 \mu\text{M}$  for TCOH formation) and valproic acid ( $K_i = 1215.8 - \mu\text{M}$  for TCA formation and  $K_i = 932.8 \mu\text{M}$  for TCOH formation). The inhibition was found to be partial non competitive for both drugs. Our results confirm the existence of interactions between TCE and a variety of widely used drugs. Further efforts are undertaken to determine if these interactions are plausible in humans and if they can impact the risk of toxicity of TCE in medicated population.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Trichloroethylene (TCE) is a widely used chemical to which humans are frequently exposed. This common organic volatile solvent has a wide spectrum of applications in a variety of industries. For instance, TCE is currently used for metal degreasing and cold cleaning of parts, as low-temperature heat transfer fluid as solvent in the textile industry and as ingredient in the manufacturing of some products (e.g., paints, adhesives, lubricants). Historically, TCE has also been used as an ingredient in spot removers and cleaning fluids for rugs (Lloyd et al., 1975). In medicine and veterinary practice, trichloroethylene was popular as a general anesthetic in surgical, dental and obstetrical procedures, as well as a disinfectant and detergent for skin, minor wounds and surgical instruments (IARC, 1979).

Recycling and adequate disposal of this chemical is still a major problem and TCE pollution represents a serious environment

hazard. According to the U.S. Environmental Protection Agency (EPA), an estimated 540 million kg of TCE are released to the atmosphere and 9.1 million kg to the ocean each year; which is about 60% of the world annual production. In the United States of America only, according to the National Institute of Occupational Safety and Health (NIOHS) statistics, 3.5 million workers are exposed each year to trichloroethylene. The sources of exposure are numerous. Among others, drinking contaminated water and inhalation of polluted air in workplace and around landfill sites (Ford et al., 1995; James, 1963; Kleinfeld and Tabershaw, 1954; McCarthy and Jones, 1983; Smith, 1966).

The toxicity of TCE to human health has been demonstrated by several studies. The harmful effect of TCE exposure is caused not only by the parent product but also by the complex mixture of metabolites resulting from its biotransformation which is responsible of the worst effects (Barton and Clewell, 2000; Barton and Das, 1996; Bull, 2000; Bull et al., 2002). For instance, the results of (Ho et al., 2003) reported toxic effects and mechanisms of cell death caused by exposure to chloral hydrate (CH) in rats liver cells and human lymphocytes. Toxic effects of exposure to CH have also

\* Corresponding author. Tel.: +1 514 343 6111x38166; fax: +1 514 343 2200.  
E-mail address: [sami.haddad@umontreal.ca](mailto:sami.haddad@umontreal.ca) (S. Haddad).

been demonstrated by (George et al., 2000); they noticed an increase of hepatocellular carcinoma cases and in the number of animals which developed tumors. According to the results of (Ge et al., 2001), TCA and DCA are not only responsible of DNA hypomethylation and proliferation of peroxisomes, but also causing liver cancer. Finally, (Green et al., 2003) reported that trichloroethanol (TCOH) causes an acidification of urine and increases urinary methylmalonic acid and plasma *N*-methyltetrahydrofolate in exposed rats to TCE. Several potential tumor target organs for TCE have been identified and significant differences have been reported between males and females, among species and among different strains of given species (Lash et al., 2006). For some strains of male mice, liver and lungs have been designated as the principle affected organs while kidneys, Leydig cells and the hematopoietic system are the principle target organs in male rats. Epidemiology studies for humans identified several potential target organs including kidneys, liver, cervix and hematopoietic cells (i.e. non-Hodgkin's lymphoma) (Wartenberg et al., 2000).

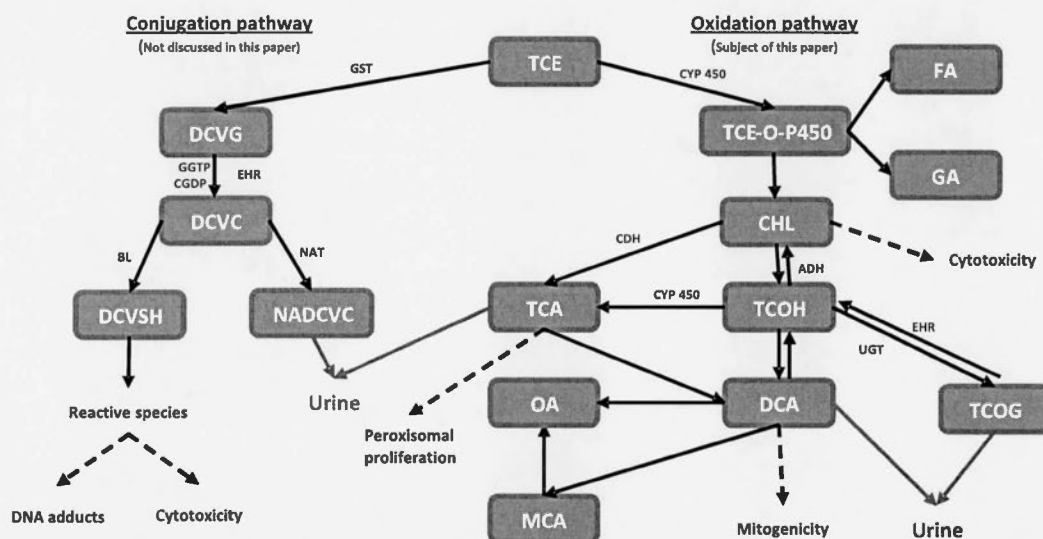
Three possible routes of absorption of trichloroethylene have been identified: dermal, oral and especially by inhalation. The absorbed dose of TCE by animals or humans quickly gets into the bloodstream and reaches target organs such as liver, kidneys and nervous system. Liver is the principle site of biotransformation of this chemical. TCE is predominantly metabolized by oxidation and the contribution of GSH-conjugation route is secondary (Fig. 1) (Lash et al., 2000). In the first step of the oxidation route, TCE is metabolized into chloral hydrate (CHL) essentially by the action of CYP2E1 (Lipscomb et al., 1997; Nakajima et al., 1992). Subsequently, the chloral hydrate is transformed either by oxidation to trichloroacetic acid (TCA) or by reduction to trichloroethanol (TCOH) which is a non-carcinogenic metabolite (Fig. 1). The first pathway is catalyzed by alcohol dehydrogenase (Jadhav et al., 2007) and the second by aldehyde oxidase (CDH) (Bonse et al., 1975; Daniel, 1963; Ikeda et al., 1980; Miller and Guengerich, 1983). Analyses also revealed the presence of other minor metabolites; mainly monoxide and dioxide of carbon in exhaled air and oxalic acid and a mixture of trichloroacetic acid, aminoethanol-*N*-hydroxyacetyl acids and mono and dichloroacetic (MCA and

DCA) in urine (Birner et al., 1993; Dekant, 1984; Dekant et al., 1990, 1986a,b; Hathaway, 1980; Ogata and Saeki, 1974; Traylor et al., 1977). The other route of biotransformation of TCE, taking place also in the liver, is the GSH conjugation. Catalyzed by glutathione *S*-transferase, a glutathione conjugate which is the *S*-(1,2-dichlorovinyl) glutathione (DCVG) (GST) is formed. Then the DCVG is metabolized by the  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGTP) to free glutamic acid and cysteine conjugate form (Fig. 1) (Dekant et al., 1990).

According to the American Conference of Government Industrial Hygienists (ACGIH, 1992), the threshold limit value (TLV) for TCE is currently 50 ppm as an 8-h time-weighted average (TWA) and the short-term exposure limit is 200 ppm. TLV value is based on central nervous system (CNS) effects (headaches, fatigue, irritability) and the short-term exposure limit purpose is to protect against its anesthetic effects (ACGIH, 1992). These limit values for workplace are well above the recent EPA guidelines (U.S.EPA, 2011). Accordingly, an RfC of 0.4 ppb is proposed for non-cancer effects (i.e., heart malformations in rats, immunotoxicity in mice), a value derived from a oral exposure study on increased fetal cardiac malformations in Sprague Dawley rats (Johnson et al., 2003). Furthermore, TCE is considered carcinogenic in humans by all routes of exposure based on evidence of causal associations between TCE and expose and kidney cancer. The proposed lifetime inhalation RfC for cancer is 0.2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (0.05 ppb) for a risk level of  $10^{-6}$  (Raaschou-Nielsen et al. 2003; U.S. EPA, 2011).

Additionally, there is an ever increasing consumption of drugs that may modulate this risk when co-exposure occurs. Indeed, pharmaceuticals, which are biologically active, may influence the metabolism of trichloroethylene in the liver and thus affect its pharmacokinetic and/or its pharmacodynamic and consequently its toxicity in the target tissue. Toxicokinetic interactions on TCE have recently been reported with aspirin and acetaminophen but no other related published research can be found for other drugs (Plewka et al., 2000; Zielińska-Psujka et al., 2001).

This research aims to identify drugs that can interfere with the metabolism of TCE (oxidative pathway only) and hence that have the potential to modulate the health risk related to TCE exposure. In order to achieve this goal, metabolic interactions between



**Fig. 1.** Metabolic pathway of trichloroethylene. (Right pathway) CDH, chloral deshydrogenase (aldehyde oxidase); ADH, alcohol dehydrogenase; EHR, enterohepatic recirculation; FA, formic acid; GA, glyoxalic acid; TCE-O-P450, oxygenated TCE-cytochrome P450 transition state; TCOG, TCOH glucuronide; UGT, uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferase; TCE, trichloroethylene; TCA, trichloroacetic acid; OA, oxalic acid; MCA, monochloroacetic acid; CHL, chloral; TCOH, trichloroethanol; DCA, dichloroacetic acid; (left pathway) BL, cysteine conjugate 1-lyase; CGDP, cysteinyl-glycine dipeptidase; DCVG, dichlorovinyl glutathione; DCVSH, dichlorovinyl mercaptan; NADCV, *N*-acetyl dichlorovinylcysteine; GGTP,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase; GST, glutathione *S*-transferase; DCVC, dichlorovinylcysteine; NAT, *N*-acetyltransferase. Figure adapted from Lash et al. (2000).



trichloroethylene and 14 widely used drugs have been studied *in vitro*. The selected drugs are: acetaminophen, salicylic acid, ibuprofen, mefenamic acid, naproxen, amoxicillin, erythromycin, diclofenac, valproic acid, carbamazepine, gliclazide, cimetidine, ranitidine, and sulfasalazine. Rat hepatocyte suspensions are used to identify potential interacting drugs and rat liver microsomes to characterize most potent drug-TCE interactions that have been identified.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and material

Cryopreserved rat hepatocytes from Sprague Dawley (pooled from 12 animals, M00005, Lot MRK) and microsomes (pooled from 12 animals, M00001, Lot DTT) were purchased from Celsis *In Vitro* Technologies (Baltimore, MD, USA) and ZenBio (Research Triangle, NC, USA). The cells were stored in liquid nitrogen until use. Amoxicillin (97.8%), carbamazepine (>99%), cimetidine (>99%), ranitidine (>99%), gliclazide (99.5%), erythromycin (95.1%), valproic acid (100%), naproxen (98%), sulfasalazine (98%), ibuprofen (99.8%), diclofenac (>99%), acetaminophen (100%), mefenamic acid (99.7%), salicylic acid (99.9%), William's medium E (WME), newborn calf serum (NCS), 2,2,2 trichloroethanol (TCOH),  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ( $\beta$ -NADP<sup>+</sup>), glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>), Brij58 and uridine diphosphate glucuronic acid (UDPGA, 99.7%) were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Trichloroethylene (TCE, ACS) came from VWR Chemical Suppliers-BDH (Radnor, PA, USA). Trichloroacetic acid (TCA, 99%) and dichloroacetic acid (DCA) were purchased from Anachemia Science (Montreal, QC, CANADA). Sulphuric acid (95–98%) were supplied by Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Methanol (HPLC, 99.8%) came from Caledon Biotech Inc. (Vista, CA, USA). Finally, nanopure water was prepared in our laboratory using Nanopure Diamond System (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA).

### 2.2. Assessment of metabolic interactions in rat hepatocyte suspensions

Just before use, hepatocytes were thawed according to the supplier's instructions and counted. Cell viability was determined by trypan-blue exclusion method. Hepatocytes were diluted to a concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml with WME medium and transferred to 20 ml gas chromatography (GC) vials in 0.145 ml aliquots. Suspensions were pre-incubated for 20 min with and without drugs dissolved in WME (10% NCS) at concentrations 10 times higher than the therapeutically maximum concentrations observed in human blood (Table 1). TCE (0.01 mM = 5 km) was added in a small volume of incubation medium to each vial and the suspensions were incubated with TCE for 120 min at 37 °C and agitated at 150 rpm. Incubations were initiated upon introduction of TCE. Controls (vials without drugs but TCE added) are considered at time  $t = 0$ , i.e., when TCE is added to vials. After incubation, reactions were stopped by adding 350  $\mu$ l of esterifying solution (H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/methanol, 6:5:1) to enable volatilization of acetates. The durations of incubation are based on preliminary tests, in which the percentage of metabolites formed and the cell viability after incubation time were measured. Testing of cell viability showed no significant difference between controls and co-exposed (TCE and drugs) suspensions, ensuring that cell viability is not affected by the selected drug concentrations. After two hours of incubation, cells exposed to TCE alone and those co-exposed to drugs (acetaminophen, diclofenac, sulphasalazine) exhibited a cell viability of respectively  $27.4 \pm 3\%$  and  $20 \pm 5\%$ . Furthermore, a previous

published study from our laboratory (Verner et al., 2009) did not see any significant change in cell viability with drug concentrations that were 50 times higher than maximal therapeutic concentrations.

Higher than therapeutic blood concentrations of drugs (10 times) have been used for easier and better identification of drugs that do interact with the metabolism of TCE, which is the main purpose of this *in vitro* part of our research project. (Verner et al., 2009) adopted a similar strategy i.e. using drug concentrations 50 times higher than the therapeutic blood concentrations for identification of interactions between the same drugs and *n*-nonylphenol and bisphenol A in rat hepatocytes. In our experiments, drugs were dissolved in the same medium used for hepatocytes (i.e., William's medium) and TCE was dissolved in ethanol prior to addition to the incubation medium.

### 2.3. Confirmation and characterization of metabolic interactions

Two steps followed the identification of drug-TCE interactions in rat hepatocytes as described above: (1) the five drug-TCE interactions that were strongest were confirmed using rat liver microsomes (RLM) for either inhibition of TCOH glucuronidation if metabolite levels were greater than control or inhibition of TCE oxidation if metabolite levels were lower than control, and (2) those confirmed were then characterized to determine the type of inhibition and  $K_i$  values. In both TCE oxidation and TCOH glucuronidation reactions, RLM were suspended in 0.1 M phosphate buffer (pH = 7.4) with a concentration of 2 mg/ml using 145  $\mu$ l in 20 ml vials. For glucuronidation, MgCl<sub>2</sub> (5 mM), (Brij58) (0.05%) and UDPGA (5 mM) were added to the buffer. After 45 min of incubation, reaction was stopped by a thermal shock of 100 °C during 30 min. For oxidation, the buffer preparation contained 10 mM of glucose-6-phosphate, 2 units/ml of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 1 mM of NADP<sup>+</sup> and 5 mM of MgCl<sub>2</sub>. The oxidation reaction was incubated for 120 min and reaction was stopped by adding 350  $\mu$ l of esterifying solution. Preliminary tests showed that reaction rates were linear up to 45 min for glucuronidation of TCOH acid and up to 120 min for hydroxylation of TCE in microsomal protein concentrations up to 2 mg/ml.

Before performing a full characterisation, identified potent metabolic interactions were confirmed by incubating rat microsomes with drugs at same drug concentrations as used during incubations with hepatocytes (i.e.  $10 \times C_{max}$ ). To characterize the inhibition of TCE (or TCOH) metabolism by drugs (i.e. determine the type of inhibition and  $K_i$  values), metabolic inhibition tests were performed using five inhibitor concentrations of selected drugs and three substrate (i.e., TCOH or TCE) concentrations. Inhibitors were added to the medium as dissolved aliquots in the same phosphate buffer.

### 2.4. Chemical analysis by GC-MS

TCE, TCOH and methyl-esterified TCA and DCA (m-TCA and m-DCA) were analyzed by headspace gas chromatography coupled with mass spectrometry using an Agilent 5975C gas chromatograph linked to single quadrupole mass spectrometer (Agilent 7890A GC-MS) and a headspace autosampler (CTC CombiPal). Samples in vials were heated to 125 °C for 20 min before headspace injection into the GC-MS. The samples were injected in a HP-5MS column: (30 m  $\times$  250  $\mu$ m  $\times$  0.25  $\mu$ m) in a split mode (17:1). Helium (He) was used as mobile phase and injection was regulated to a rate of 1 ml/min. Temperature parameters for the column, injector and detector were respectively 135, 200 and 230 °C. Finally, the retention times for TCE, m-DCA, TCOH and m-TCA were 2.81, 5.05, 5.34 and 5.68 min, respectively. Only trichloroethylene and its metabolites (TCA, TCOH and DCA) were followed for quantitative analyses.

**Table 1**

Maximum drug concentrations in human blood during exposure to therapeutic dosage and drug concentrations used in the screening part of this study with rat hepatocytes (Verner et al., 2009).

Drugs	Treatment classes	Plasma Cmax (μM)	Drug concentration in assays (mM)
Acetaminophen	Analgesic, antipyretic	100 <sup>a</sup>	1
Salicylic acid	Non-steroidal anti-inflammatory	490 <sup>b</sup>	4.9
Ibuprofen	Non-steroidal anti-inflammatory	50 <sup>c</sup>	0.5
Mefenamic acid	Non-steroidal anti-inflammatory	29 <sup>d</sup>	0.29
Naproxen	Non-steroidal anti-inflammatory	374 <sup>e</sup>	3.74
Diclofenac	Non-steroidal anti-inflammatory	5 <sup>f</sup>	0.05
Cimetidine	Anticonvulsive	12 <sup>g</sup>	0.12
Valproic acid	Anticonvulsive	481 <sup>h</sup>	4.81
Carbamazepine	Anticonvulsive	38 <sup>i</sup>	0.38
Gliclazide	Anti-diabetic	46 <sup>j</sup>	0.46
Ranitidine	H <sub>2</sub> blocker	1 <sup>k</sup>	0.01
Sulfasalazine	Anti-inflammatory	14 <sup>l</sup>	0.14
Amoxicillin	Antibiotic	9 <sup>m</sup>	0.09
Erythromycin	Antibiotic	4 <sup>n</sup>	0.04

<sup>a</sup> (Rawlins et al., 1977).

<sup>b</sup> (Brantmark et al., 1982).

<sup>c</sup> (De Brabander et al., 2000).

<sup>d</sup> (Neuvonen and Kivisto, 1988).

<sup>e</sup> (Mrosczak et al., 1988).

<sup>f</sup> (Kirchheiner et al., 2003).

<sup>g</sup> (Grahnen et al., 1979).

<sup>h</sup> (Husseln et al., 1994).

<sup>i</sup> (Miller and Ludden, 1993).

<sup>j</sup> (Davis et al., 2000).

<sup>k</sup> (Morichau-Beauchant et al., 1986).

<sup>l</sup> (Allgayer et al., 1984).

<sup>m</sup> (Bodey and Nance, 1972).

<sup>n</sup> (Thompson et al., 1980).

## 2.5. Data analysis and statistics

Concentrations of trichloroethylene and its metabolites (TCA and TCOH) in co-incubations with drugs were compared to those in control samples using standard *T*-Test. Statistical analyses were computed using the Sigma Stat module version 3.11 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). Enzyme kinetic constants were calculated by non-linear regression model using SigmaPlot Enzyme Kinetics module version 9.01 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

## 3. Results

### 3.1. In vitro identification of metabolic interactions

*In vitro* experiments revealed that biotransformation of trichloroethylene is significantly affected only by some of the 14 selected drugs. Drugs can be segregated into four groups following the obtained screening results (Fig. 2). Group 1 is composed of drugs causing no significant interactions. Drugs of groups 2 and 3 significantly affect both TCE metabolites, respectively by increasing and decreasing TCA and TCOH levels. For these drugs, TCA and TCOH levels were affected approximately in the same proportion. Finally, group 4 includes drugs significantly affecting only one metabolite either TCA or TCOH. Tables 2 and 3 give details about how each drug is affecting TCE biotransformation. The effect of selected drugs on DCA levels was not assessed since the concentrations of this chemical, in exposed samples as well as in controls, were too low to be measured by GC–MS. Preliminary simulations of TCE metabolism modulation using a published PBPK model (Clewelly and Andersen, 2004) indicated no significant effect on metabolite levels of the GSH pathway. We therefore chose not to examine GSH pathway during this investigation. No significant changes in hepatocyte viability were noticed when co-incubated samples (30%) were compared to drug-free control (25%) incubations. The five chemicals showing the strongest

interactions were: naproxen, salicylic acid, valproic acid, acetaminophen and gliclazide (Tables 2 and 3).

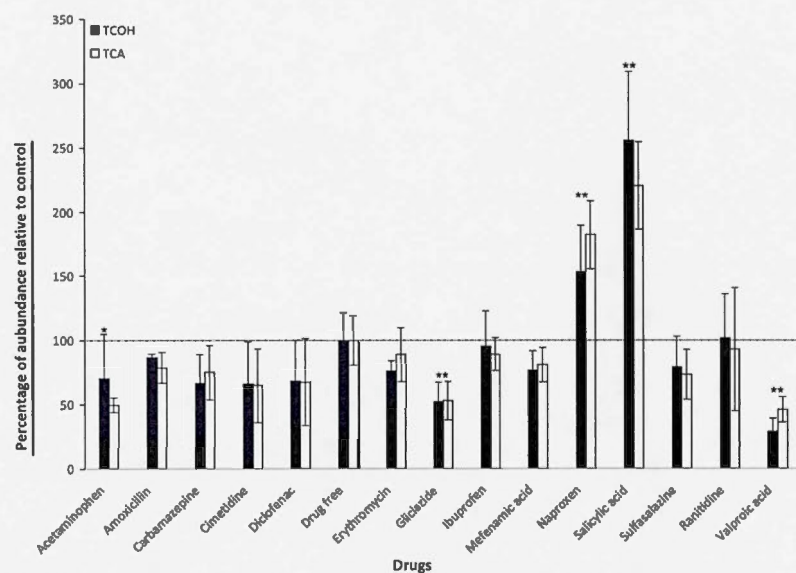
#### 3.1.1. Confirmation and characterisation of metabolic interactions in rat hepatic microsomes: trichloroethanol glucuronidation.

Following the identification part of this study, our focus narrowed to the five drugs presenting the highest potential of metabolic interactions. The criteria for this selection are an increase or a decrease greater than 50% in metabolite levels with a  $p \leq 0.001$ . A single exception of this rule was for acetaminophen for which  $p \leq 0.005$  for TCOH because this compound was also reported to interact with TCE in another study (Plewka et al., 2000). Confirmation and characterisation of trichloroethanol glucuronidation using rat hepatic microsomes has been limited to drugs of group 2 i.e. naproxen and salicylic acid. Results show that naproxen inhibits glucuronidation of TCOH by acting directly on the enzyme responsible of this biotransformation (Fig. 3). But in the case of salicylic acid, no inhibition was detected in microsomal co-incubations assays (Fig. 3). Trichloroethanol glucuronidation was then characterized using permeated rat liver microsomes and biotransformation kinetic constants were determined by non-linear regression of metabolic velocity data (Fig. 4). Simple one-substrate Michaelis–Menten kinetics is best described by Eq. (1) with  $R^2$  values above 0.99.

$$\text{Velocity} = \frac{V_{\max} \times C}{K_{\text{mapp}} + C} \quad (1)$$

where  $V_{\max}$  is the maximum enzymatic velocity,  $K_{\text{mapp}}$  is the apparent affinity constant and  $C$  is the substrate concentration of trichloroethanol. TCE was glucuronidated in microsome suspensions with calculated values of  $K_{\text{mapp}} = 0.7632$  mM and  $V_{\max} = 0.01084$  mmol min<sup>−1</sup> mg<sup>−1</sup>.

The inhibition of TCOH metabolism by naproxen was also characterized. Experiments with rat liver microsome suspensions were carried out to assess the impact on trichloroethanol glucuronida-



**Fig. 2.** Inhibition of trichloroethylene biotransformation by drugs in suspended rat hepatocytes exposed to TCE ( $n = 5$ ). Samples were incubated with TCE ( $0.01 \mu\text{M}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  for 120 min and agitated at 150 rpm. Initial drug concentrations were equal to 10 times the maximum plasma concentrations following a therapeutic dose in humans ( $10 \times \text{Cmax}$ ). Error bars represent the standard deviation (SD).  $**p \leq 0.001$  and  $*p < 0.05$  for both measured metabolites.

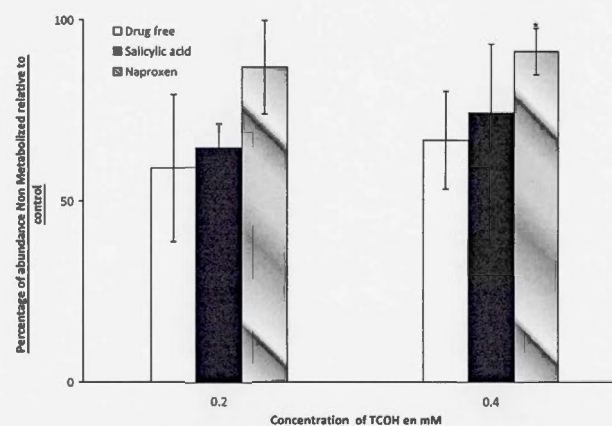
**Table 2**  
Interaction groups of selected drugs and their effect on TCE metabolism.

Group	General effect	Drugs	Impact on TCA levels	Impact on TCOH levels
Group 1	No significant effect	Amoxicillin Carbamazepine Ibuprofen Mefenamic acid Ranitidine	Not significant	Not significant
Group 2	Increase both TCA and TCOH levels	Naproxen Salicylic acid	2 fold $\uparrow$ 2.2 fold $\uparrow$	1.5 fold $\uparrow$ 2.5 fold $\uparrow$
Group 3	Decrease both TCA and TCOH levels	Acetaminophen Cimetidine Diclofenac Gliclazide Valproic acid	2 fold $\downarrow$ 0.25 fold $\downarrow$ 0.3 fold $\downarrow$ 2 fold $\downarrow$ 2 fold $\downarrow$	0.3 fold $\downarrow$ 0.25 fold $\downarrow$ 0.3 fold $\downarrow$ 2 fold $\downarrow$ 3 fold $\downarrow$
Group 4	Affect either TCA or TCOH levels	Erythromycin Sulphasalazine	0.25 fold $\downarrow$ 0.3 fold $\downarrow$	Not significant Not significant

**Table 3**  
Results of T-test of selected drugs.

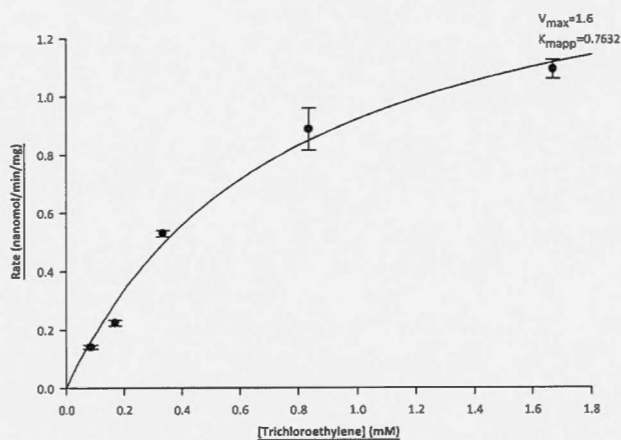
Drugs	Number of replicates	P_TCOH	P_TCA
Acetaminophen	5	0.005	<0.001
Amoxicillin	5	NS	NS
Carbamazepine	5	NS	NS
Cimetidine	5	0.016	0.014
Diclofenac	5	0.016	0.011
Gliclazide	5	<0.001	<0.001
Erythromycin	5	0.006	NS
Ibuprofen	5	NS	NS
Mefenamic acid	5	NS	NS
Naproxen	5	0.001	<0.001
Salicylic acid	5	0.001	<0.001
Sulphasalazine	5	NS	0.008
Ranitidine	5	NS	NS
Valproic acid	5	<0.001	<0.001

tion of co-exposure to naproxen. Concentration-dependent inhibition data of trichloroethanol metabolism with naproxen was recorded and analyzed using a non-linear regression model. The results revealed a partial competitive inhibition which can be described by Eq. (2):



**Fig. 3.** Impact of drugs ( $10 \times \text{Cmax}$ ) on trichloroethanol metabolism in rat liver microsomes ( $n = 5$ ) exposed to TCOH. Samples with microsomal protein concentration of  $2 \text{ mg/ml}$  were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 45 min and agitated at 150 rpm. TCOH concentrations used were: 0.2 and 0.4 mM. Error bars represent the standard deviation (SD).  $*p < 0.05$ .





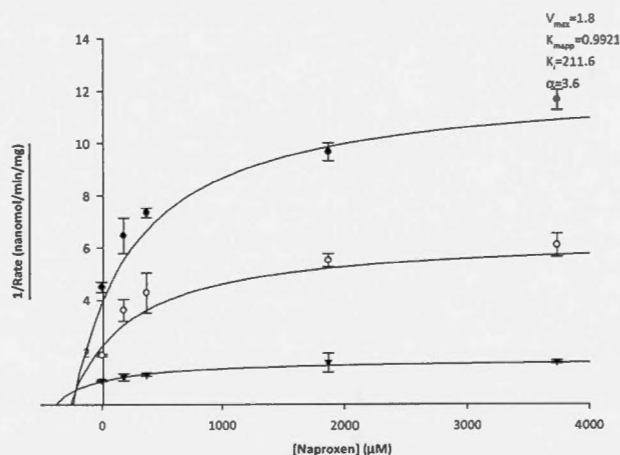
**Fig. 4.** Michaelis–Menten kinetics for TCOH disappearance by glucuronidation in rat liver microsomes ( $n = 3$ ). Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 45 min and agitated at 150 rpm. Five substrate concentrations were used: 0.0835, 0.167, 0.334, 0.835 and 1.67 mM. Error bars represent the standard deviation (SD).

$$\text{Velocity} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_{\text{mapp}}}{C}\right) \times \left(\frac{1 + \frac{C_i}{K_{i\text{app}}}}{1 + \alpha K_{i\text{app}}}\right)} \quad (2)$$

where  $V_{\max}$  is the maximum enzymatic velocity,  $K_{\text{mapp}}$  is the apparent affinity constant,  $C_i$  is the inhibitor concentration,  $K_{i\text{app}}$  is the apparent inhibition constant,  $C$  is the substrate concentration and  $\alpha$  is a constant. Glucuronidation was inhibited by naproxen with calculated values of  $K_{i\text{app}} = 211.6 \mu\text{M}$  and  $\alpha = 3.6$ . The non-linear regression descriptive model of this partial competitive inhibition kinetics fitted experimental data with  $R^2 > 0.97$  (Fig. 5).

### 3.1.2. Confirmation and characterisation of metabolic interaction in rat hepatic microsomes: trichloroethylene oxidation

Confirmation and characterization of trichloroethylene oxidation were performed for group 3 drugs that demonstrated greater and significant interactions i.e. acetaminophen, gliclazide and valproic acid. Experimental results confirm the existence of an



**Fig. 5.** Dixon plots for inhibition of TCOH glucuronidation by naproxen in rat liver microsomes ( $n = 3$ ). Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 45 min and agitated at 150 rpm. Three substrate [(●) 0.167, (○) 0.334 and (▼) 1.67 mM] and five inhibitor (0, 187, 374, 1870 and 3740  $\mu\text{M}$ ) concentrations were used. Error bars represent the standard deviation (SD).

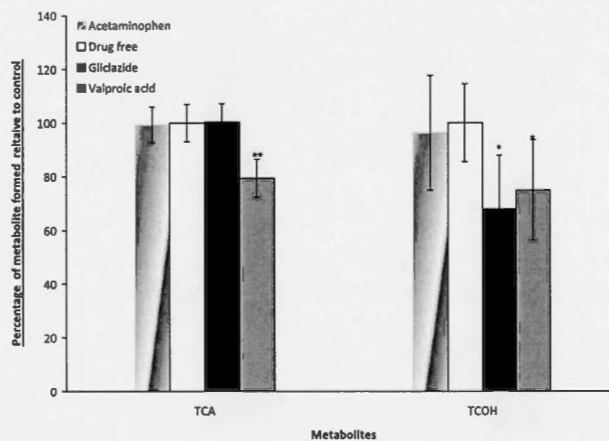
inhibition of the oxidation pathway of TCE. For valproic acid, this inhibition affects both metabolites i.e. TCA and TCOH, for gliclazide TCOH only, while for acetaminophen no effect was detected (Fig. 6). Trichloroethylene oxidation was then characterized using rat liver microsomes. Metabolic constants were determined by non-linear regression of velocity data (Figs. 7 and 8). Simple one-substrate Michaelis–Menten kinetics is best described by Eq. (1) with  $R^2$  values above 0.95 for TCOH and 0.98 for TCA. Trichloroethylene was oxidized in microsomal suspensions with a  $K_{\text{mapp}} = 8.85 \mu\text{M}$  for TCOH formation and  $K_{\text{mapp}} = 4.49 \mu\text{M}$  for TCA formation. When correcting for partitioning to determine concentrations in incubation medium using Poulin and Haddad (2011), a log  $P$  of 2.42 and a Henry's constant of 0.00985 Atm-m<sup>3</sup>/mole at 25 °C, the  $K_{\text{mapp}}$  in incubation medium ( $K_{\text{mmedium}}$ ) is equal to 20.9 and 10.6  $\mu\text{M}$  for TCOH and TCA formation, respectively. The  $V_{\max}$  values for TCOH and TCA formation are 0.2214 and 0.1117  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , respectively.

### 3.1.3. Characterization of trichloroethylene metabolism inhibition by gliclazide

The inhibition of TCE oxidation by gliclazide, resulting in a decrease of TCOH, was characterized. Experiments with rat liver microsome suspensions were carried out to assess the impact of co-exposure to gliclazide on the oxidation of trichloroethylene. Concentration-dependent inhibition data of trichloroethylene metabolism with gliclazide was recorded and analyzed using a non-linear regression model (Dixon plots presented in Fig. 9). The results indicate a partial non competitive inhibition, which can be described by Eq. (3):

$$\text{Velocity} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_{\text{mapp}}}{C}\right) \times \left(1 + \frac{C_i}{K_{i\text{app}}}\right) \times \left(1 + C_i \times \frac{\beta}{K_{i\text{app}}}\right)} \quad (3)$$

where  $V_{\max}$  is the maximum enzymatic velocity,  $K_{\text{mapp}}$  is the apparent affinity constant,  $C_i$  is the inhibitor concentration,  $K_{i\text{app}}$  is the apparent inhibition constant,  $C$  is the substrate concentration and  $\beta$  is a constant. Trichloroethanol formation was inhibited by gliclazide with estimated values of  $K_{i\text{app}} = 58 \mu\text{M}$  and  $\beta = 0.66$ . The non-linear regression descriptive model of this partial non competitive inhibition kinetics fitted experimental data with  $R^2 > 0.99$ .



**Fig. 6.** Impact of drugs ( $10 \times C_{\text{max}}$ ) on TCOH and TCA appearance following oxidation in rat liver microsomes ( $n = 5$ ) exposed to TCE (0.01 mM). Incubations were performed for 120 min at 37 °C and 150 rpm using a microsomal protein concentration of 2 mg/ml. Error bars represent the standard deviation (SD). \*:  $p < 0.05$ .

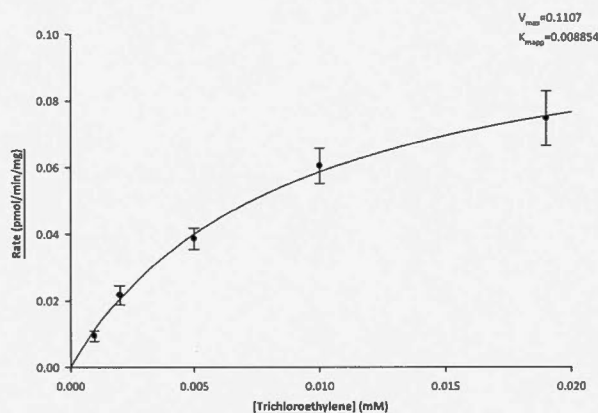


Fig. 7. Michaelis-Menten kinetics for TCOH appearance following oxidation in rat liver microsomes ( $n = 3$ ). Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 120 min and agitated at 150 rpm. Substrate concentrations of 0.001, 0.002, 0.005, 0.01 and 0.02 mM were used. Error bars represent the standard deviation (SD).

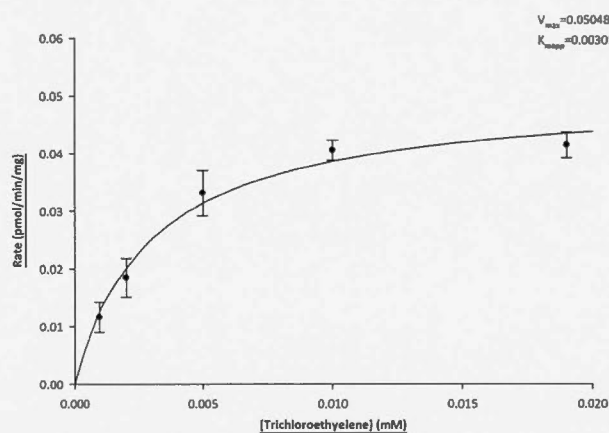


Fig. 8. Michaelis-Menten kinetics for trichloroacetic acid (TCA) formation in rat liver microsomes ( $n = 3$ ). Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 120 min and agitated at 150 rpm. Substrate concentrations of 0.001, 0.002, 0.005, 0.01 and 0.02 mM were used. Error bars represent the standard deviation (SD). (N.B.: concentrations based on amount of TCE injected in 20 ml vial).

### 3.1.4. Characterization of trichloroethylene metabolism inhibition by valproic acid

The inhibition of TCE metabolism by valproic acid, resulting in a decrease of TCOH, was also characterized. Experiments with rat liver microsome suspensions were carried out to assess the impact of co-exposure to valproic acid on the oxidation of trichloroethylene. Concentration-dependent inhibition data of trichloroethylene metabolism with valproic acid as well as the formation of trichloroethanol and trichloroacetic was recorded and analyzed using a non-linear regression model (Dixon plots presented in Figs. 10 and 11). The results indicate a partial non competitive inhibition, which can be described by Eq. (3). The formation of trichloroethanol was inhibited by valproic acid with estimated values of  $K_{iapp} = 932.8 \mu\text{M}$  and  $\beta = 0.5543$ . The formation of trichloroacetic acid was inhibited by valproic acid with estimated  $K_{iapp} = 1251.8 \mu\text{M}$  and  $\beta = 0.6615$ . The non-linear regression descriptive model of this partial non competitive inhibition kinetics fitted experimental data with  $R^2 > 0.99$ .

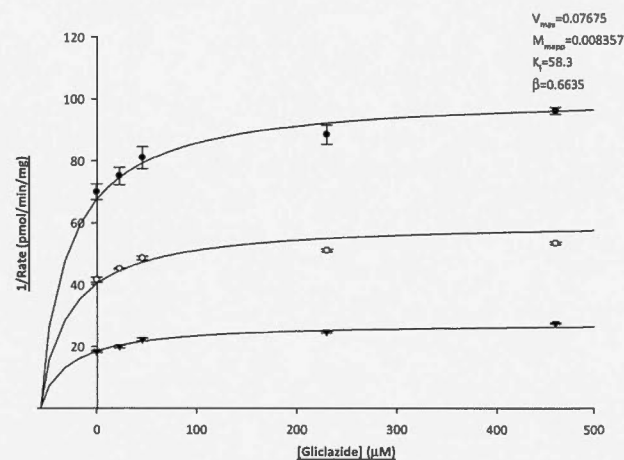


Fig. 9. Dixon plots for inhibition of trichloroethanol (TCOH) formation by gliclazide in rat liver microsomes ( $n = 3$ ). Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 120 min and agitated at 150 rpm. Three substrate [(●) 0.002, (○) 0.004 and (▽) 0.02 mM] and five inhibitor (0, 23, 46, 230 and 460  $\mu\text{M}$ ) concentrations were used. Error bars represent the standard deviation (SD).

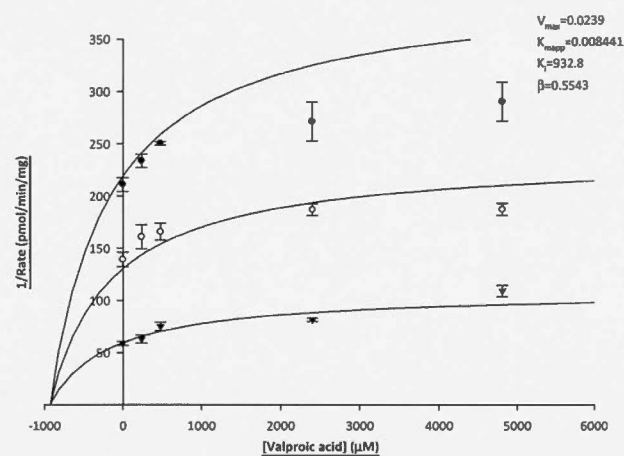


Fig. 10. Dixon plots for inhibition of trichloroethanol (TCOH) formation by valproic acid in rat liver microsomes ( $n = 3$ ). Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 120 min and agitated at 150 rpm. Three substrate [(●) 0.002, (○) 0.004 and (▽) 0.02 mM] and five inhibitor (0, 240.5, 481, 2405 and 4810  $\mu\text{M}$ ) concentrations were used. Error bars represent the standard deviation (SD). \*:  $p < 0.05$ .

## 4. Discussion

Fourteen widely consumed drugs, belonging to a wide spectrum of therapeutic classes, have been selected for this research aiming to explore co-exposure to drug-pollutant modulation effect on trichloroethylene metabolism (i.e. oxidative pathway). Evidence of such metabolic interactions exists for TCE in the literature but only for very few drugs. Our *in vitro* results from incubations in rat hepatocyte suspensions segregated the selected drugs into four groups (Table 2). Drugs of group 1 (amoxicillin, carbamazepine, ibuprofen, mefenamic acid and ranitidine) showed no effect on TCE metabolism. The obvious explanation would be the distinct metabolic pathways used by TCE and the drugs of this group. Although also metabolized mainly through oxidation, the P450 enzymes involved for these five drugs are different from those for TCE. For these drugs biotransformation, the involved enzymes are: CYP2C9, CYP2C8 and CYP2C19 for ibuprofen (De Oliveira et al., 2005; Hamman et al., 1997); CYP2D6, CYP2C9, and CYP2C19

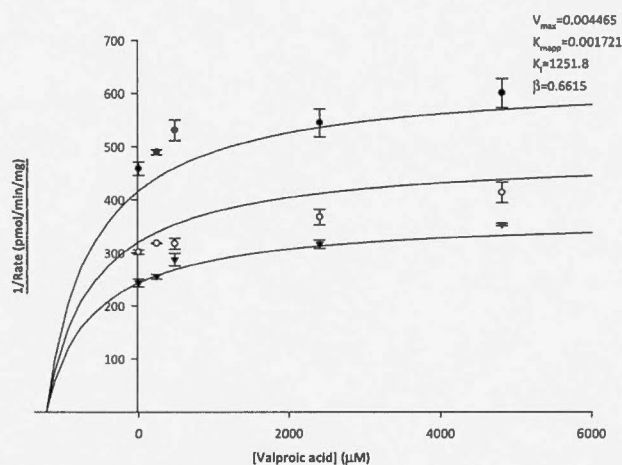


Fig. 11. Dixon plots for inhibition of trichloroacetic acid (TCA) formation rate by valproic acid in rat liver microsomes ( $n = 3$ ). Samples with microsomal protein concentration of 2 mg/ml were incubated at 37 °C for 120 min and agitated at 150 rpm. Three substrate [(●) 0.002, (○) 0.004 and (□) 0.02 mM] and five inhibitor (0, 240.5, 481, 2405 and 4810  $\mu$ M) concentrations were used. Error bars represent the standard deviation (SD).

for amoxicillin (Drawz and Bonomo, 2010; Grant, 2005); CYP3A4 for carbamazepine (Kerr et al., 1994); CYP2C9 for mefenamic acid (Bonnabry et al., 1996) and CYP2C19, CYP2D6 and CYP1A2 for ranitidine (Chung et al., 2000).

Drugs of group 4 (erythromycin and sulphasalazine) affect either TCA or TCOH levels, but the increase or decrease observed is clearly less pronounced than what was measured with group 2 (naproxen and salicylic acid) and 3 (acetaminophen, glacialide, valproic acid, cimetidine, and diclofenac). For these 3 last groups of drugs, cytotoxicity is an unlikely source of observed interactions as mentioned earlier and furthermore interactions were also observed with subcellular fractions.

We intentionally choose to narrow our focus to drugs of these groups 2 and 3 after the exploratory part of this research. The second part is dedicated to the confirmation and characterisation of the strongest interactions using rat microsomes.

The metabolic interactions with salicylic acid and acetaminophen reported in rat hepatocyte suspensions were not observable when using rat microsomal assays. Plausible explanation for salicylic acid could be that the observed increase with hepatocytes may results from an inhibition of glucuronidation by one of the drug's metabolites, or by a disruption of the UDPGA homeostasis. But none of these two phenomena can be observed during microsomal assays. Similar results have been reported by (Verner et al., 2009) when they explored metabolic interactions between salicylic acid and *n*-nonylphenol and bisphenol A. They reported a high level of interaction between salicylic acid and *n*-nonylphenol and bisphenol A in hepatocyte suspensions, but none of these interactions was observed with microsomes. (Verner et al., 2009) explained the differences of results observed with hepatocytes and microsomes by the presence of mechanisms other than direct enzyme inhibition by the parent product, such as an inhibition by one of the drug's metabolites, disruption of carriers or disturbance of homeostasis of UDPGA. Another plausible explanation for the increase of metabolite levels in hepatocytes (i.e. TCA and TCOH) in the presence of salicylic acid may be an induction of CYP450. (Zielińska-Psujka et al., 1999) reported such an induction during an *in vivo* treatment by this drug. This was also observed by (Damme et al., 1996) and (Favari et al., 1997), confirming that acetylsalicylic acid can act as an inducer of CYP450. Further investigations are still

needed to elucidate the mechanism of the observed inhibition in hepatocytes.

For acetaminophen, the decrease of TCOH and TCA levels noticed with rat hepatocytes was also not observed in microsomal incubations. According to the literature acetaminophen is known to be a CYP450 inducer, but this effect occurs only after at least two hours of exposure to the drug (Plewka et al., 2000). In our case, the cells were exposed to acetaminophen for 20 min during pre-incubation and 2 h during co-exposure. There is little difference in time and furthermore the observable goes against what would be expected (i.e. an increase in metabolite levels). Perhaps an acetaminophen metabolite formed in hepatocyte and not in microsome would result in TCE oxidation inhibition or glucuronidation induction by this metabolite. This suggests that this drug does not significantly directly inhibit CYP450 2E1 in its unchanged form in the concentrations and conditions used in this study. Further investigations are still needed to elucidate the mechanism of the observed inhibition in hepatocytes.

Naproxen, valproic acid and glacialide are the drugs that presented metabolic interactions *in vitro* and which were positively confirmed using microsomes. Increased levels of metabolites, i.e. TCA and TCOH, induced by naproxen can be explained by an inhibition of the enzyme responsible of glucuronidation since it is the main route of biotransformation of this drug by isoform UGT 2B7. This hypothesis is supported by the validation with rat microsomes and is consistent with the results of (Verner et al., 2009). Their results demonstrate that *n*-nonylphenol and bisphenol A biotransformations are competitively inhibited by naproxen. Decreased levels of TCE metabolites (i.e. TCOH and TCA) caused by valproic acid and glacialide may be explained by inhibition of CYP450 as demonstrated in microsomal assays. The valproic acid is an antiepileptic drug that is metabolized by several enzymes of the CYP450 family such as CYP 1A1/2, CYP 1B1 and CYP 2E1. These three enzymes are directly involved in the metabolism of trichloroethylene (Kiang et al., 2006). As for glacialide, this drug is suggested to be metabolized primarily by CYP450 isoforms CYP 2C9 and CYP 2C19 (Park et al., 2003; Zhang et al., 2007) although this has not been yet confirmed experimentally. This wouldn't explain the interaction observed with TCE. Perhaps glacialide has a certain affinity to CYP 2E1 without actually being a substrate.

The strongest inhibitions observed with rat hepatocytes and confirmed with microsomal assays were further characterized by performing enzyme kinetics in microsomes and data were analyzed using the SigmaPlot software. The three concerned drugs are naproxen, valproic acid and glacialide. The calculated values of the inhibition constants for naproxen and glacialide were respectively 211.6 and 58.3  $\mu$ M. These values are close to the maximum human blood concentrations which can vary from 305 to 473  $\mu$ M for naproxen (Mrosczak et al., 1988) and from 46 to 58.7  $\mu$ M for glacialide (Davis et al., 2000). These results are very important in the risk assessment of trichloroethylene exposure. But, further investigations are needed to adequately evaluate whether chronic use of naproxen and glacialide can significantly reduce the metabolism of the pollutant in the liver and intestinal tissues and thus lead to higher internal exposure.  $K_{iapp}$  values determined from co-incubation assays with valproic acid were more than an order of magnitude greater than the maximum concentration in human blood published in the literature. This indicates that a significant metabolic interaction at the therapeutic level is unlikely to occur if human  $K_i$  values are of similar values.

## 5. Conclusion

The present study demonstrates that some drugs have the potential to interfere with the metabolism of TCE at the level of



oxidation or glucuronidation. These drugs are naproxen, valproic acid and glimepiride. They are often taken on a chronic basis and could alter the internal doses of TCE and/or metabolites and therefore may alter the risk associated to TCE exposure in medicated population. Current efforts are being deployed to determine the human *in vivo* significance.

## 6. Conflict of interest

The authors have no conflict to disclose.

## Acknowledgments

This study was supported by a Discovery Grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

## References

- ACGIH, 1992. Notice of intended change-trichloroethylene. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 7.
- Allgayer, H., Kruis, W., Eisenburg, J., Paumgartner, G., 1984. Comparative pharmacokinetics of sulphasalazine and sulphapyridine after rectal and oral administration to patients with ulcerative colitis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 26, 275–277.
- Barton, H.A., Clewell, H.J., 2000. Evaluating non-cancer effects of trichloroethylene: dosimetry, mode of action, and risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 108, 323–334.
- Barton, H.A., Das, S., 1996. Alternatives for a risk assessment on chronic non-cancer effects from oral exposure to trichloroethylene. *Regul. Toxicol. Pharm.* 24, 269–285.
- Birner, G., Vamvakas, S., Dekant, W., Henschler, D., 1993. Nephrotoxic and genotoxic N-acetyl-S-dichlorovinyl-L-cysteine is a urinary metabolite after occupational 1,1,2-trichloroethene exposure in humans: implications for the risk of trichloroethene exposure. *Environ. Health Perspect.* 99, 281–284.
- Bodey, G.P., Nance, J., 1972. Amoxicillin: *in vitro* and pharmacological studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1, 358–362.
- Bonnabry, P., Leemann, T., Dayer, P., 1996. Role of human liver microsomal CYP2C9 in the biotransformation of lornoxicam. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 49, 305–308.
- Bonse, G., Urban, T., Reichert, D., Henschler, D., 1975. Chemical reactivity, metabolic oxirane formation and biological reactivity of chlorinated ethylenes in the isolated perfused rat liver preparation. *Biochem. Pharmacol.* 24, 1829–1834.
- Brantmark, B., Wahlin-Boll, E., Melander, A., 1982. Bioavailability of acetylsalicylic acid and salicylic acid from rapid- and slow-release formulations, and in combination with dipyridamol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 22, 309–314.
- Bull, R.J., 2000. Mode of action of liver tumor induction by trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetate and dichloroacetate. *Environ. Health Perspect.* 108, 241–259.
- Bull, R.J., Orner, G.A., Cheng, R.S., Stillwell, L., Stauber, A.J., Sasser, L.B., Lingohr, M.K., Thrall, B.D., 2002. Contribution of dichloroacetate and trichloroacetate to liver tumor induction in mice by trichloroethylene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 55–65.
- Chung, W.G., Park, C.S., Roh, H.K., Lee, W.K., Cha, Y.N., 2000. Oxidation of ranitidine by isozymes of flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450. *Jpn. J. Pharmacol.* 84, 213–220.
- Clewell, H.J., Andersen, M.E., 2004. Applying mode-of-action and pharmacokinetic considerations in contemporary cancer risk assessments: an example with trichloroethylene. *Crit. Rev. Toxicol.* 34, 385–445.
- Damme, B., Darmer, D., Pankow, D., 1996. Induction of hepatic cytochrome P4502E1 in rats by acetylsalicylic acid or sodium salicylate. *Toxicology* 106, 99–103.
- Daniel, J.W., 1963. The metabolism of 36Cl-labelled trichloroethylene and tetrachloroethylene in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 12, 795–802.
- Davis, T.M., Daly, F., Walsh, J.P., Ilett, K.F., Beilby, J.P., Dusci, L.J., Barrett, P.H., 2000. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of glimepiride in Caucasians and Australian Aborigines with type 2 diabetes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 49, 223–230.
- De Brabander, C., Vervaeke, C., Gortz, J.P., Remon, J.P., Berlo, J.A., 2000. Bioavailability of ibuprofen from matrix mini-tablets based on a mixture of starch and microcrystalline wax. *Int. J. Pharm.* 208, 81–86.
- De Oliveira, A.R.M., Evandro, J.C., Pierina, S.B., 2005. Solid-phase microextraction and chiral HPLC analysis of ibuprofen in urine. *J. Chromatogr.* 818, 285–291.
- Dekant, W., 1984. Novel metabolites of trichloroethylene through dechlorination reactions in rats, mice and humans. *Biochem. Pharmacol.* 33, 2021–2027.
- Dekant, W., Koob, M., Henschler, D., 1990. Metabolism of trichloroethene – *in vivo* and *in vitro* evidence for activation by glutathione conjugation. *Chem. Biol. Interact.* 73, 89–101.
- Dekant, W., Metzler, M., Henschler, D., 1986a. Identification of S-1,2-dichlorovinyl-N-acetyl-cysteine as a urinary metabolite of trichloroethylene: a possible explanation for its nephrocarcinogenicity in male rats. *J. Biochem. Toxicol.* 1, 57–72.
- Dekant, W., Schulz, A., Metzler, M., Henschler, D., 1986b. Absorption, elimination and metabolism of trichloroethylene: a quantitative comparison between rats and mice. *Xenobiotica* 16, 143–152.
- Drawz, S.M., Bonomo, R.A., 2010. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 160–201.
- Favari, L., Soto, C., Mourelle, M., 1997. Effect of portal vein ligation and silymarin treatment on aspirin metabolism and disposition in rats. *Biopharm. Drug Dispos.* 18, 53–64.
- Ford, E.S., Rhodes, S., McDiarmid, M., 1995. Deaths from acute exposure to trichloroethylene. *J. Occup. Environ. Med.* 37, 749–754.
- Ge, R., Yang, S., Kramer, P.M., Tao, L., Pereira, M.A., 2001. The effect of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid on DNA methylation and cell proliferation in B6C3F1 mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 100–106.
- George, M.H., Moore, T., Kilburn, S., Olson, G.R., DeAngelo, A.B., 2000. Carcinogenicity of chloral hydrate administered in drinking water to the male F344/N rat and male B6C3F1 mouse. *Toxicol. Pathol.* 28, 610–618.
- Grahn, A., von Bahr, C., Lindstrom, B., Rosen, A., 1979. Bioavailability and pharmacokinetics of cimetidine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 16, 335–340.
- Grant, R.W., 2005. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N. Engl. J. Med.* 352, 2211–2221.
- Green, T., Dow, J., Foster, J., 2003. Increased formic acid excretion and the development of kidney toxicity in rats following chronic dosing with trichloroethanol, a major metabolite of trichloroethylene. *Toxicology* 191, 109–119.
- Hamman, M.A., Thompson, G.A., Hall, S.D., 1997. Regioselective and stereoselective metabolism of ibuprofen by human cytochrome P450 2C. *Biochem. Pharmacol.* 54, 33–41.
- Hathaway, D.E., 1980. Consideration of the evidence for mechanisms of 1,2-trichloroethylene metabolism, including new identification of its dichloroacetic and trichloroacetic acid metabolites in mice. *Cancer Lett.* 8, 263–269.
- Ho, Y.S., Ma, H.Y., Chang, H.Y., Wei, B.L., Lee, C.C., Ho, S.Y., Guo, H.R., Wu, T.P., Chang, W.H., Wang, Y.J., 2003. Lipid peroxidation and cell death mechanisms in rats and human cells induced by chloral hydrate. *Food Chem. Toxicol.* 4, 621–629.
- Hussein, Z., Mukherjee, D., Lamm, J., Cavanaugh, J.H., Granneman, G.R., 1994. Pharmacokinetics of valproate after multiple-dose oral and intravenous infusion administration: gastrointestinal-related diurnal variation. *J. Clin. Pharmacol.* 34, 754–759.
- IARC, 1979. Trichloroethylene. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans 20, 545–572.
- Ikedo, M., Miyake, Y., Ogata, M., Ohmori, S., 1980. Metabolism of trichloroethylene. *Biochem. Pharmacol.* 29, 2983–2992.
- Jadhav, S.H., Sarkar, S.N., Aggarwal, M., Tripathi, H.C., 2007. Induction of oxidative stress in erythrocytes of male rats subchronically exposed to a mixture of eight metals found as groundwater contaminants in different parts of India. *Arch. Environ. Contam. Toxicol. Appl. Pharmacol.* 52, 145–151.
- James, W.R.L., 1963. Fatal addition to trichloroethylene. *Br. J. Ind. Med.* 20, 47–49.
- Johnson, P.D., Goldberg, S., Mays, M., Dawson, B.V., 2003. Threshold of trichloroethylene contamination in maternal drinking waters affecting fetal heart development in the rat. *Environ. Health Perspect.* 111, 289–292.
- Kerr, B.M., Thummel, K.E., Wurden, C.J., Klein, S.M., Kroetz, D.L., Gonzalez, F.J., Levy, R.H., 1994. Human liver carbamazepine metabolism. Role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10,11-epoxide formation. *Biochem. Pharmacol.* 47, 1969–1979.
- Kiang, T.K.L., Ping, C.H., Reza Anari, M., Tong, V., Abbott, F.S., Chang, T.K.H., 2006. Contribution of CYP 2C9, CYP 2A6, and CYP 2B6 to valproic acid metabolism in hepatic microsomes from individuals with the CYP 2C9\*1/\*1 genotype. *Toxicol. Sci.* 1–26.
- Kirchheiner, J., Meineke, I., Steinbach, N., Meisel, C., Roots, I., Brockmoller, J., 2003. Pharmacokinetics of diclofenac and inhibition of cyclooxygenases 1 and 2: no relationship to the CYP2C9 genetic polymorphism in humans. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 55, 51–61.
- Kleinfeld, M., Tabershaw, I.R., 1954. Trichloroethylene toxicity: report of five fatal cases. *Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.* 10, 134–141.
- Lash, L.H., Fisher, J.W., Lipscomb, J.C., Parker, J.C., 2000. Metabolism of trichloroethylene. *Environ. Health Perspect.* 108, 177–200.
- Lash, L.H., Putt, D.A., Parker, J.C., 2006. Metabolism and tissue distribution of orally administered trichloroethylene in male and female rats: identification of glutathione- and cytochrome P-450-derived metabolites in liver, kidney, blood, and urine. *J. Toxicol. Environ. Health* 69, 1285–1309.
- Lipscomb, J.C., Garrett, C.M., Snawder, J.E., 1997. Cytochrome P450-dependent metabolism of trichloroethylene: interindividual differences in humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142, 311–318.
- Lloyd, J.W., Moore Jr., R.M., Breslin, P., 1975. Background information on trichloroethylene. *J. Occup. Med.* 17, 603–605.
- McCarthy, T.B., Jones, R.D., 1983. Industrial gassing poisonings due to trichloroethylene, perchloroethylene, and 1,1,1-trichloroethane, 1961–80. *Br. J. Ind. Med.* 40, 450–455.
- Miller, R.E., Guengerich, F.P., 1983. Metabolism of trichloroethylene in isolated hepatocytes, microsomes, and reconstituted enzyme systems containing cytochrome P-450. *Cancer Res.* 43, 1145–1155.
- Miller, R., Ludden, T.M., 1993. Bioavailability of controlled release carbamazepine estimated by mixed effect modelling. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 44, 231–235.
- Morichau-Beuchant, M., Houin, G., Mavie, P., Alexandre, C., Dhumeaux, D., 1986. Pharmacokinetics and bioavailability of ranitidine in normal subjects and cirrhotic patients. *Dig. Dis. Sci.* 31, 113–118.
- Mroszczak, E., Yee, J.P., Bynum, L., 1988. Absorption of naproxen controlled-release tablets in fasting and postprandial volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 28, 1128–1131.

- Nakajima, T., Wang, R.S., Elovaara, E., Park, S.S., Gelboin, H.V., Vainio, H., 1992. A comparative study on the contribution of cytochrome P450 isozymes to metabolism of benzene, toluene and trichloroethylene in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 43, 251–257.
- Neuvonen, P.J., Kivisto, K.T., 1988. Effect of magnesium hydroxide on the absorption of tolafenamic and mefenamic acids. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 35, 495–501.
- Ogata, M., Saeki, T., 1974. Measurement of chloral hydrate, trichloroethanol, trichloroacetic acid and monochloroacetic acid in the serum and the urine by gas chromatography. *Int. Arch. Arbeitsmed.* 33, 49–58.
- Park, J.Y., Kim, K.A., Park, P.W., Park, C.W., Shin, J.G., 2003. Effect of rifampin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of gliclazide. *Clin. Pharmacol. Ther.* 74, 334–340.
- Plewka, A., Zielińska-Psujka, B., Kowalówka-Zawieja, J., Nowaczyk-Dura, G., Plewka, D., Wiaderkiewicz, A., Kamiński, M., Orłowski, J., 2000. Influence of acetaminophen and trichloroethylene on liver cytochrome P450-dependent monooxygenase system. *Acta Biochim. Pol.* 47, 1129–1136.
- Poulin, P., Haddad, S., 2011. Microsome composition-based model as a mechanistic tool to predict nonspecific binding of drugs in liver microsomes. *J. Pharm. Sci.* 100, 4501–4517.
- Raaschou-Nielsen, O., Hansen, J., McLaughlin, J.K., Kolstad, H., Christensen, J.M., Tarone, R.E., Olsen, J.H., 2003. Cancer risk among workers at Danish companies using trichloroethylene: a cohort study. *Am. J. Epidemiol.* 158, 1182–1192.
- Rawlins, M.D., Henderson, D.B., Hijab, A.R., 1977. Pharmacokinetics of paracetamol (acetaminophen) after intravenous and oral administration. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 11, 283–286.
- Smith, G.F., 1966. Trichloroethylene: a review. *Br. J. Ind. Med.* 23, 249–262.
- Thompson, P.J., Burgess, K.R., Marlin, G.E., 1980. Influence of food on absorption of erythromycin ethyl succinate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18, 829–831.
- Traylor, P.S., Nastainczyk, W., Ullrich, V., 1977. Conversion of trichloroethylene to carbon monoxide by microsomal cytochrome P-450. In: *Proceedings of the 3rd international symposium on microsomes and drug oxidations*, 615–621.
- U.S. EPA. (U.S. Environmental Protection Agency), 2011. *Toxicological review of Trichloroethylene (CASRN 79-01-6) in support of summary information on the Integrated Risk Information System (IRIS)*. (EPA/635/R-09/011F). Washington, DC.
- Verner, M.-A., Magher, T., Haddad, S., 2009. High concentrations of commonly used drugs can inhibit the in vitro glucuronidation of bisphenol A and nonylphenol in rats. *Xenobiotica*, 1–10.
- Wartenberg, D., Reyner, D., Scott, C.S., 2000. Trichloroethylene and cancer: epidemiological evidence. *Environ. Health Perspect.* 108, 161–176.
- Zhang, Y., Si, D., Chen, X., Lin, N., Guo, Y., Zhou, H., Zhong, D., 2007. Influence of CYP 2C9 and CYP 2C19 genetic polymorphisms on pharmacokinetics of gliclazide MR in Chinese subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 64, 67–74.
- Zielińska-Psujka, B., Orowski, J., Plewka, A., Kamiński, M., Kowalówka-Zawieja, J., Zięba-Proc, B., 1999. Metabolic interactions in rats treated with acetylsalicylic acid and trichloroethylene. *Pol. J. Environ. Stud.* 5, 319–325.
- Zielińska-Psujka, B., Orowski, J., Plewka, A., Kamiński, M., Kowalówka-Zawieja, J., 2001. Metabolic interactions between acetylsalicylic acid, xylene and trichloroethylene in rats. *Pol. J. Environ. Stud.* 1, 43–49.

## Bibliographie

- Abbott, F. S., et M. R. Anari. 1999. «Chemistry and biotransformation». Dans *Milestones in Drug Therapy-Valproate*, W. Loscher, p. 47-75. Basel Switzerland: Birkhauser Verlag.
- Abramson, S., et G. Weissmann. 1989. «The mechanism of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs». *Arthritis Rheum*, vol. 32, p. 1-8.
- Adeyeye, C. M., et P.-K. Li. 1990. «Diclofenac sodium». Dans *Analytical Profiles of Drug Substances*, K. Florey, p. 123-141. New York: Academic Press.
- Al-Shareef, A., D. C. Buss, H. G. M. Shetty, N. Ali et P. A. Routledge. 1997. «The Effect of Repeated-Dose Activated Charcoal on the Pharmacokinetics of Sodium Valproate in Healthy Volunteers». *Br J Clin Pharmacol*, vol. 43, p. 109-111.
- Allgayer, H., W. Kruis, J. Eisenburg et G. Paumgartner. 1984. «Comparative pharmacokinetics of sulphasalazine and sulphapyridine after rectal and oral administration to patients with ulcerative colitis». *Eur J Clin Pharmacol*, vol. 26, p. 275-277.
- Amaral, M. H., J. M. Lobo et D. C. Ferreira. 2001. «Naproxen availability from variable-dose and weight sustained-release tablets». *Drug Dev Ind Pharm*, vol. 27, no 3, p. 221-225.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). 1992. «Notice of intended change-trichloroethylene». *Appl Occup Environ Hyg*, vol. 7, no 786-791
- Anders, M. W., et W. Dekant. 1998. «Glutathione-dependent bioactivation of haloalkanes». *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, vol. 38, p. 501-537.



- Anders, M. W., L. H. Lash, W. Dekant, A. A. Elfarra et D. R. Dohn. 1988. «Biosynthesis and metabolism of glutathione conjugates to toxic forms». *Crit Rev Toxicol*, vol. 18, p. 331–341.
- Andersen, M. E. 1981. «A physiologically based toxicokinetic description of the metabolism of inhaled gases and vapors: Analysis at steady state». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 60, p. 509–526.
- Aronoff, D. M., J. A. Oates et O. Bouteau. 2006. «New insights into the mechanism of action of acetaminophen: Its clinical pharmacologic characteristics reflect its inhibition of the two prostaglandin H<sub>2</sub> synthases». *Clin Pharmacol Ther*, vol. 79, no 1, p. 9–19.
- Astrand, I., et P. Ovreim. 1976. «Exposure to trichlorethylene. I. Uptake and distribution in man». *Scand J Work Environ Health*, vol. 4, p. 199–211.
- ATSDR (1997). Toxicological profile for trichloroethylene (Update). US Dept of Health and Human Service. Atlanta, GA.: 293 p
- Austin, K. L., L. E. Mather, C. R. Philpot et P. J. McDonald. 1980. «Intersubject and dose-related variability after intravenous administration of erythromycin». *Br J Clin Pharmacol*, vol. 10, no 3, p. 273–279.
- Bagnall, W. E., J. Kelleher, B. E. Walker et M. S. Losowsky. 1979. «The gastrointestinal absorption of paracetamol in the rat». *J Pharm Pharmacol*, vol. 31, no 3, p. 157–160.
- Bahal, N., et M. C. Nahata. 1992. «The new macrolide antibiotics: azithromycin, clarithromycin, dirithromycin, and roxithromycin». *Ann Pharmacother*, vol. 26, no 1, p. 46–55.
- Banerjee, T., S. K. Singh et N. Kishore. 2006. «Binding of naproxen and amitriptyline to bovine serum albumin: biophysical aspects». *J Phys Chem B*, vol. 110, no 47, p. 24147–24156.

- Barat, I., F. Andreassen et E. M. S. Damsgaard. 2000. «The consumption of drugs by 75-year-old individuals living in their own homes». *Eur J Clin Pharmacol*, vol. 56, no 6-7, p. 501-509.
- Baron, J. A., et R. S. Sandler. 2000. «Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention». *Annu Rev Med*, vol. 51, p. 511-523.
- Barton, H. A., et H. J. Clewell. 2000. «Evaluating noncancer effects of trichloroethylene: dosimetry, mode of action, and risk assessment». *Environ Health Perspect*, vol. 108, no Suppl 2, p. 323.
- Barton, H. A., J. R. Creech, C. S. Godin, G. M. Randall et C. S. Seckel. 1995. «Chloroethylene mixtures: pharmacokinetic modeling and *in vitro* metabolism of vinyl chloride, trichloroethylene, and trans-1, 2-dichloroethylene in rat». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 130, no 2, p. 237-247.
- Barton, H.A., et S. Das. 1996. «Alternatives for a risk assessment on chronic non-cancer effects from oral exposure to trichloroethylene». *Regul. Toxicol. Pharm.*, vol. 24, p. 269-285.
- Bartonicek, V. 1962. «Metabolism and excretion of trichloroethylene after inhalation by human subjects». *Br J Ind Med*, vol. 19, p. 134-141.
- Baxter, K., A. Lee et I. H. Stockley. 2008. «Drug-Drug Interactions». Dans *Drug Benefits and Risks : International Textbook of Clinical Pharmacology*, p. 247-262. Amsterdam, The Netherlands: IOS Press.
- Beck, B. D., R. B. Conolly, M. L. Dourson, D. Guth, D. Hattis, C. Kimmel et S. C. Lewis. 1993. «Improvements in quantitative noncancer risk assessment. Sponsored by the Risk Assessment Specialty Section of the Society of Toxicology». *Fundam Appl Toxicol*, vol. 20, p. 1-14.
- Ben Amar, M. 2004. «Mécanismes d'interactions pharmacologiques». Dans *La poly consommation des psychotropes et les principales interactions*

*pharmacologiques associées*, Comité permanent de la lutte de la toxicomanie, p. 16–23. Montréal, Québec.

- Birner, G., S. Vamvakas, W. Dekant et D. Henschler. 1993. «Nephrotoxic and genotoxic N-acetyl-S-dichlorovinyl-L-cysteine is a urinary metabolite after occupational 1, 1, 2-trichloroethene exposure in humans: implications for the risk of trichloroethene exposure». *Environ Health Perspect*, vol. 99, p. 281–284.
- Bodey, G. P., et J. Nance. 1972. «Amoxicillin: *in vitro* and pharmacological studies». *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 1, p. 358–362.
- Bogen, K. T., et L. S. Gold. 1997. «Trichloroethylene cancer risk: simplified calculation of PBPK-Based MCLs for cytotoxic end points. ». *Regul Toxicol Pharmacol*, vol. 25, p. 26–43.
- Bohman, T., J. Myren et S. Larsen. 1980. «Inhibition of the histamine-stimulated gastric secretion in healthy subjects by the H<sub>2</sub>-receptor antagonist ranitidine». *Scand J Gastroenterol*, vol. 15, no 2, p. 183–189.
- Bonnabry, P., T. Leemann et P. Dayer. 1996. «Role of human liver microsomal CYP2C9 in the biotransformation of lornoxicam». *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 49, no 4, p. 305–308.
- Bonse, G., T. Urban, D. Reichert et D. Henschler. 1975. «Chemical reactivity, metabolic oxirane formation and biological reactivity of chlorinated ethylenes in the isolated perfused rat liver preparation». *Biochem Pharmacol*, vol. 24, p. 1829–1834.
- Bosma, A., A. Brouwer et W. F. Seifert. 1988. «Synergism between ethanol and carbon tetrachloride in the generation of liver fibrosis». *J Pathol*, vol. 156, p. 15–21.
- Brantmark, B., E. Wahlin-Boll et A. Melander. 1982. «Bioavailability of acetylsalicylic acid and salicylic acid from rapid-and slow-release

- formulations, and in combination with dipyridamol.». *Eur J Clin Pharmacol*, vol. 22, p. 309–314.
- Brodie, B. B. , et J. Axelrod. 1949. «The fate of acetophenetidin (phenacetin) in man and methods for the estimation of acetophenetidin and its metabolites in biological material. ». *J Pharmac exp Therap*, vol. 97, p. 58–67.
- Brogden, R. N., R. C. Heel, T. M. Speight et G. S. Avery. 1978. «Cimetidine: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in peptic ulcer disease». *Drugs*, vol. 15, p. 93–131.
- Brogden, R. N., R. C. Heel, T. M. Speight et G. S. Avery. 1979. «Naproxen up to date: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy and use in rheumatic diseases and pain states». *Drugs*, vol. 18, no 4, p. 241–277.
- Bruening, T., et H. M. Bolt. 2000. «Renal toxicity and carcinogenicity of trichloroethylene: key results, mechanisms, and controversies». *Crit Rev Toxicol*, vol. 30, p. 253–285.
- Bull, R. J. . 2000. «Mode of action of liver tumor induction by trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetate and dichloroacetate». *Environ Health Perspect*, vol. 108, p. 241–259.
- Bull, R. J., G. A. Orner, R. S. Cheng, L. Stillwell, A. J. Stauber, L. B. Sasser, M. K. Lingohr et B. D. Thrall. 2002. «Contribution of dichloroacetate and trichloroacetate to liver tumor induction in mice by trichloroethylene». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 182, p. 55–65.
- Bull, R. J., I. M. Sanchez, M. A. Nelson, J. L. Larson et A. J. Lansing. 1990. «Liver tumor induction in B6C3F1 mice by dichloroacetate and trichloroacetate». *Toxicology*, vol. 63, no 3, p. 341–359.
- Bull, R. J., L. B. Sasser et X. C. Lei. 2004. «Interactions in the tumor-promoting activity of carbon tetrachloride, trichloroacetate, and dichloroacetate in the liver of male B6C3F1 mice». *Toxicology*, vol. 199, no 2–3, p. 169–183.

- Burgess, W. A. (1995). Recognition of Health Hazards in Industry. A Review of Materials and Processes. New York, John Wiley&Sons: 538 p
- Byington, K. H., et K. C. Leibman. 1965. «Metabolism of trichloroethylene in liver microsomes II. Identification of the reaction product as chloral hydrate». *Mol Pharmacol*, vol. 1, no 3, p. 247–254.
- Calabrese, R. L. 1991. «The center cannot hold». *Current Biology*, vol. 1, no 3, p. 185–187.
- Caldwell, J., J. O’Gorman et R. L. Smith. 1980. «Inter-individual differences in the glycine conjugation of salicylic acid (proceedings)». *Br J Clin Pharmacol*, vol. 9, p. 114–116.
- Caraco, Y., E. Zylber-Katz, E. M. Berry et M. Levy. 1995. «Carbamazepine pharmacokinetics in obese and lean subjects». *Ann Pharmacother*, vol. 29, p. 843–847.
- Chamouard, J. M., J. Barre, S. Urien, G. Houin et J. P. Tillement. 1985. «Diclofenac binding to albumin and lipoproteins in human serum». *Biochem Pharmacol*, vol. 34, no 10, p. 1695–16700.
- Champion, G. D., et G. G. Graham. 1978. «Pharmacokinetics of non-steroidal anti-inflammatory agents». *Aust N Z J Med*, vol. 8, no 1, p. 94–100.
- Chandrasekharan, N. V., H. Dai, K. L. Roos, N. K. Evanson, J. Tomsik, T. S. Elton et D. L. Simmons. 2002. «COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no 21, p. 13926–13931.
- Cheikh Rouhou, M., et S. Haddad. 2013. «Modulation of trichloroethylen *In Vitro* metabolism by different drugs in human». *submitted to Toxicol in Vitro*.



- Cheikh Rouhou, M., I. Rheault et S. Haddad. 2012. «Modulation of trichloroethylene *In Vitro* metabolism by different drugs in rats». *Toxicol in Vitro*, vol. 27, p. 34–43.
- Chelvan, P., J. M. Hamilton–Miller et W. Brumfitt. 1979. «Biliary excretion of erythromycin after parenteral administration». *Br J Clin Pharmacol*, vol. 8, no 3, p. 233–235.
- Chung, W. G., C. S. Park, H. K. Roh, W. K. Lee et Y. N. Cha. 2000. «Oxidation of ranitidine by isozymes of flavin–containing monooxygenase and cytochrome P450». *Jpn. J. Pharmacol.*, vol. 84, no 2, p. 213–220.
- Clewell, H. .J., et M. E. Andersen. 2004. «Applying mode–of–action and pharmacokinetic considerations in contemporary cancer risk assessments: an example with trichloroethylene ». *Crit Rev Toxicol*, vol. 34, p. 385–445.
- Clewell, H. J 3rd., P. R Gentry, T. R. Covington et J. M. Gearhart. 2000. «Development of a physiologically based pharmacokinetic model of trichloroethylene and its metabolites for use in risk assessment». *Environ Health Perspect*, vol. 108, p. 283–305.
- Clewell, H. J. III. 1993. «Coupling of computer modeling with in vitro methodologies to reduce animal usage in toxicity testing». *Toxicol Lett*, vol. 68, p. 101–117.
- Clewell, H. J. III., et M. E. Andersen. 1985. «Risk assessment extrapolations and physiological modeling». *Toxicol Ind Health*, vol. 4, p. 111–131.
- Clewell, H. J. III., et M. E. Andersen. 1989. «Biologically motivated models for chemical risk assessment». *Health Phys*, vol. 1, p. 129–137.
- Clewell, H. J. III., et B. M. Jarnot. 1994. « Incorporation of pharmacokinetics in noncancer risk assessment: example with chloropentafluorobenzene». *Risk Anal*, vol. 14, p. 265–276.



- CMR. 1983. «Chemical profile–Trichloroethylene». *Chemical Marketing Reporter*, vol. 14.
- Collin, J., H. Doucet, D. Lafortune, L. Monnais, M. Otero, M. –E. Blanc et M. Proulx (2005). Le médicament comme objet social et culturel : recension des écrits et propositions sur les perspectives de travail à prioriser. Conseil de la santé et du bien être. Montréal: 85 p
- Cooper, K. W., et K. E. Hickman. 1982. «Refrigeration». Dans *Kirk–Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, p. 91–92. New York: John Wiley&Sons.
- Côté, M. G., G. J. Traiger et G. L. Plaa. 1974. «Effect of isopropanol–induced potentiation of carbon tetrachloride on rat hepatic ultrastructure». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 30, no 1, p. 14–25.
- Covington, T. R, H. J. Clewell et J. W. Fisher (2004). Development of a physiologically–based pharmacokinetic model of trichloroethylene and its metabolites for use in risk assessment. Georgia, Air force research laboratory: 99 p
- Cruz, L., G. Castañeda–Hernández et A. Navarrete. 1999. «Ingestion of chilli pepper (*Capsicum annuum*) reduces salicylate bioavailability after oral aspirin administration in the rat». *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 77, no 6, p. 441–446.
- Cummings, A. J., B. K. Martin et R. Renton. 1966. «The elimination of salicylic acid in man: serum concentrations and urinary excretion rates». *Br J Pharmacol*, vol. 26 p. 461–467.
- D’Souza, R. W., et H. Boxenbaum. 1988. «Physiological pharmacokinetic models: some aspects of theory, practice and potential». *Toxicol Ind Health*, vol. 4, p. 151–171.

- Dahlin, D. C., G.T. Miwa, A. Y . Lu et Nelson. S. D. 1984. «N-acetyl-p-benzoquinone imine: A cytochrome P450-mediated oxidation product of acetaminophen.». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 81, no 5, p. 1327–1331.
- Dallas, C. E., J. M. Gallo, R. Ramanathan, S. Muralidhara et J. V. Bruckner. 1991. «Physiological pharmacokinetic modeling of inhaled trichloroethylene in rats». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 110, no 2, p. 303–314.
- Damme, B., D. Darmer et D. Pankow. 1996. «Induction of hepatic cytochrome P4502E1 in rats by acetylsalicylic acid or sodium salicylate». *Toxicology*, vol. 106, no 1-3, p. 99–103.
- Daniel, F. B., A. B. DeAngelo, J. A. Stober, G. R. Olsen et N. P. Page. 1992. «Hepatocarcinogenicity of chloral hydrate, 2-chloroacetaldehyde, and dichloroacetic acid in the male B6C3F1 mouse». *Fundam Appl Toxicol*, vol. 19, p. 159–168.
- Daniel, J. W. . 1963. «The metabolism of  $^{36}\text{Cl}$ -labelled trichloroethylene and tetrachloroethylene in the rat». *Biochem Pharmacol*, vol. 12, p. 795–802.
- Dankovic, D. A., et A. J. Bailer. 1994. «The impact of exercise and intersubject variability on dose estimates for dichloromethane derived from a physiologically based pharmacokinetic model». *Fundam Appl Toxicol*, vol. 22, p. 20–25.
- Das, K. M., et R Dubin. 1976. «Clinical pharmacokinetics of sulphasalazine». *Clin Pharmacol*, vol. 1, no 6, p. 406–425.
- Davies, N. M. 1998. «Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years». *Clin Pharmacokinet*, vol. 34, p. 101–154.
- Davies, N. M., et K. E. Anderson. 1997. «Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls». *Clin Pharmacokinet*, vol. 33, no 3, p. 184–213.

- Davis, T. M., F. Daly, J. P. Walsh, K. F. Ilett, J. P. Beilby, L. J. Dusci et P. H. Barrett. 2000. «Pharmacokinetics and pharmacodynamics of gliclazide in Caucasians and Australian Aborigines with type 2 diabetes». *Br J Clin Pharmacol*, vol. 49, p. 223–230.
- De Brabander, C., C. Vervaet, J. P. Gortz, J. P. Remon et J. A. Berlo. 2000. «Bioavailability of ibuprofen from matrix mini-tablets based on a mixture of starch and microcrystalline wax». *Int J Pharm*, vol. 208, p. 81–86.
- De Oliveira, A. R. M., J. C. Evandro et S. B. Pierina. 2005. «Solid-phase microextraction and chiral HPLC analysis of ibuprofen in urine». *J. Chromatogr B Analyt Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 818, no 3, p. 285–291.
- DeAngelo, A. B., F. B. Daniel, L. McMillan, P. Wernsing et R. E. Jr. Savage. 1989. «Species and strain sensitivity to the induction of peroxisome proliferation by chloroacetic acids». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 101, p. 285–298.
- DeAngelo, A. B., F. B. Daniel, B. M. Most et G. R. Olson. 1996. «The carcinogenicity of dichloroacetic acid in the male Fischer 344 rat». *Toxicology*, vol. 114, no 3, p. 207–221.
- Degen, P. H., W. Dieterle, W. Schneider, W. Theobald et U. Sinterhauf. 1988. «Pharmacokinetics of diclofenac and five metabolites after single doses in healthy volunteers and after repeated doses in patients». *Xenobiotica*, vol. 18, no 2, p. 1449–1455.
- Dekant, W. 1984. «Novel metabolites of trichloroethylene through dechlorination reactions in rats, mice and humans». *Biochem Pharmacol*, vol. 33, no 13, p. 2021–2027.
- Dekant, W., M. Koob et D. Henschler. 1990. «Metabolism of trichloroethylene *in vivo* and *in vitro*; Evidence for activation by glutathione conjugaison». *Chem Biol Interact*, vol. 73, p. 89–101.
- Dekant, W., G. Martens, S. Vamvakas, M. Metzler et D. Henschler. 1987. «Bioactivation of tetrachloroethylene: Role of glutathione S-transferase-

catalyzed conjugation versus cytochrome P-450-dependent phospholipid alkylation». *Drug Metab Dispos*, vol. 15, p. 702-709.

- Dekant, W., M. Metzler et D. Henschler. 1986a. «Identification of S-1, 2-dichlorovinyl-Nacetyl-cysteine as a urinary metabolite of trichloroethylene: a possible explanation for its nephrocarcinogenicity in male rats». *J. Biochem. Toxicol.*, vol. 1, p. 57-72.
- Dekant, W., A. Schulz, M. Metzler et D. Henschler. 1986. «Absorption, elimination and metabolism of trichloroethylene: a quantitative comparison between rats and mice». *Xenobiotica*, vol. 16, no 2, p. 143-152.
- Dekant, W., S. Vamvakas et M. W. Anders. 1989. «Bioactivation of nephrotoxic haloalkenes by glutathione conjugation: formation of toxic and mutagenic intermediates by cysteine conjugate  $\beta$ -lyase». *Drug Metab Rev*, vol. 20, no 1, p. 43-83.
- Derra, R. F., et M. O. Schultze. 1963. «The metabolism of 35S-(1, 2-dichlorovinyl)-L-cysteine in the rat». *Biochem Pharmacol*, vol. 12, p. 465-474.
- Dissanayake, A. S., et S. C. Truelove. 1973. «Proceedings: A controlled therapeutic trial of long-term maintenance treatment of ulcerative colitis with sulphasalazine (salazopyrin)». *Gut*, vol. 14, no 10, p. 818.
- Dobrev, I. D., M. E. Etersen et R. S. H. Yang. 2001. «Assessing interactions thresholds for trichloroethylene in combination with tetrachloroethylene and 1, 1, 1-trichloroethane using gas uptake studies and PBPK modeling». *Arch Toxicol*, vol. 75, p. 134-144.
- Dobrev, I. D., M. E. Etersen et R. S. H. Yang. 2002. «In silico toxicology: simulating interaction thresholds for human exposure to mixtures of trichloroethylene, tetrachloroethylene, and 1, 1, 1-trichloroethane». *Environ Health Perspect*, vol. 10, p. 1031-1039.
- Drawz, S. M., et R. A. Bonomo. 2010. «Three decades of beta-lactamase inhibitors». *Clin Microbiol Rev*, vol. 23, no 1, p. 160-201.

- El-Masri, H. A., A. A. Constan, H. S. Ramsdell et R. S. Yang. 1996a. «Physiologically based pharmacodynamic modeling of an interaction threshold between trichloroethylene and 1, 1-dichloroethylene in Fischer 344 rats». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 141, no 1, p. 124–132.
- El-Masri, H. A., J. D. Tessari et R. S. Yang. 1996b. «Exploration of an interaction threshold for the joint toxicity of trichloroethylene and 1, 1-dichloroethylene: utilization of a PBPK model». *Arch Toxicol*, vol. 70, no 9, p. 527–539.
- Elsenhans, B., K. Schümann et W. Forth. 1991. «Toxic metals: interactions with essential metals». Dans *Nutrition, Toxicity, and Cancer*, I. R. Rowland, p. 223–258. Boca Raton, FL: CRC Press Inc.
- Emudianughe, T. S., S. O. Oduleye, J. E. E. Ebadan et S. D. Eneji. 1986. «Sex differences in salicylic acid metabolism in Nigerian subjects». *Xenobiotica*, vol. 16, no 2, p. 177–179.
- Ertle, D. H., G. Muller et M. Saassowski. 1972. «Metabolism of trichloroethylene in man. I. The significance of trichloroethanol in long-term exposure conditions». *Arch Toxikol*, vol. 29 p. 171–188.
- Ethell, B. T., G. D. Etersson et B. Burchell. 2003. «The effect of valproic acid on drug and steroid glucuronidation by expressed human UDP-glucuronosyltransferases». *Biochem Pharmacol*, vol. 65, p. 1441–1449.
- Evans, W. E., et M. V. Relling. 1999. «Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics». *Science*, vol. 286, p. 487–491.
- Faed, E. M. 1984. «Properties of acyl glucuronides: implications for studies of the pharmacokinetics and metabolism of acidic drugs». *Drug Metab Rev*, vol. 15, no 5-6, p. 1213–1249.

- Faigle, J. W., et K. F. Feldman. 1995. «Carbamazepine chemistry and biotransformation». Dans *Antiepileptic drugs*, p. 499–510. New York: Raven Press.
- Favari, L., C. Soto et M. Mourelle. 1997. «Effect of portal vein ligation and silymarin treatment on aspirin metabolism and disposition in rats». *Biopharm Drug Dispos*, vol. 18, no 1, p. 53–64.
- Fent, K., A. A. Weston et D. Caminada. 2006. «Ecotoxicology of human pharmaceuticals». *Aquat Toxicol*, vol. 76, p. 122–159.
- Fernández, J. G., P. O. Droz, B. E. Humbert et J. R. Caperos. 1977. «Trichloroethylene exposure. Simulation of uptake, excretion, and metabolism using a mathematical model». *Br J Ind Med*, vol. 34, no 1, p. 43–55.
- Fichtl, B., A. Nieciecki et K. Walter. 1991. «Tissue Binding versus plasma binding of drugs: general principles and pharmacokinetic consequences». *Adv Drug Res*, vol. 20, p. 117–166.
- Fisher, J. W., D. Mahle et R. Abbas. 1998. «A human physiologically based pharmacokinetic model for trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetic acid and free trichloroethanol». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 152, p. 339–359.
- Ford, E. S., S. Rhodes, M. McDiarmid, S. L. Schwartz et J. Brown. 1995. «Deaths from acute exposure to trichloroethylene». *J Occup Environ Med*, vol. 37, no 6, p. 749–754.
- Forkert, P. G., L. H. Lash, V. Nadeau, R. Tardif et A. Simmonds. 2002. «Metabolism and toxicity of trichloroethylene in epididymis and testis». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 182, no 3, p. 244–254.
- Forkert, P. G., L. Lash, R. Tardif, N. Tanphaichitr, C. Vandervoort et M. Moussa. 2003. «Identification of trichloroethylene and its metabolites in human



- seminal fluid of workers exposed to trichloroethylene». *Drug Metab Dispos*, vol. 31, no 3, p. 306–311.
- Frederick, C. B. 1993. «Limiting the uncertainty in risk assessment by the development of physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic models». *Toxicol Lett*, vol. 68, p. 159–175.
- Garg, D. C., D. J. Weidler, N. Baltodano et F. N. Eshelman. 1981. «Pharmacokinetics of ranitidine, a new histamine H<sub>2</sub>-receptor blocker». *Clin Pharmacol Ther*, vol. 29, p. 247–248.
- Gazzard, B. G, A. W. Ford-Hutchinson, M. J. Smith et R. Williams. 1973. «The binding of paracetamol to plasma proteins of man and pig». *J Pharm Pharmacol*, vol. 25, no 12, p. 964–967.
- Ge, R., S. Yang, P. M. Kramer, L. Tao et M. A. Pereira. 2001. «The effect of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid on DNA methylation and cell proliferation in B6C3F1 mice». *J Biochem Mol Toxicol*, vol. 15, no 2, p. 100–106.
- Gelman, A., F. Y. Bois et J. Jiang. 1996. «Physiological pharmacokinetic analysis using population modeling and informative prior distributions». *J Am Statist Ass*, vol. 91, p. 1400–1412.
- George, M. H., T. Moore, S. Kilburn, G. R. Olson et A. B. DeAngelo. 2000. «Carcinogenicity of chloral hydrate administered in drinking water to the male F344/N rat and male B6C3F1 mouse». *Toxicol Pathol*, vol. 28, p. 610–618.
- Gerlowski, L. E., et R. K. Jain. 1983. «Physiologically based pharmacokinetic modeling: principles and applications». *J Pharm Sci*, vol. 72, p. 1103–1127.
- Goldberg, M. (2003). Une Fonction majeure des protéines : la catalyse enzymatique. Regards sur la biochimie. Paris, Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM): 21–33 p

- Goldstein, R. S., W. R. Hewitt et J. B. Hook. 1990. *Toxic Interactions*. San Diego: Academic Press, 488 p.
- Gonzalez, F. J., et D. W. Nebert. 1990. «Evolution of the P450 gene superfamily: Animal-plant 'warfare', molecular drive, and human genetic differences in drug oxidation». *Trends Genet*, vol. 6, p. 182-186.
- Grahnén, A., C. Von Bahr, B. Lindström et A. Rosen. 1979. «Bioavailability and pharmacokinetics of cimetidine». *Eur J Clin Pharmacol*, vol. 16, no 5, p. 335-340.
- Grant, R. W. 2005. «Drug Metabolism and Variability among Patients in Drug Response». *N Engl J Med*, vol. 352, p. 2211-2221.
- Green, T., J. Dow et J. Foster. 2003. «Increased formic acid excretion and the development of kidney toxicity in rats following chronic dosing with trichloroethanol, a major metabolite of trichloroethylene». *Toxicology*, vol. 191, no 2-3, p. 109-119.
- Green, T., et M. S. Prout. 1985. «Species differences in response to trichloroethylene. II. Biotransformation in rats and mice». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 79, p. 401-411.
- Guengerich, F. P., D. H. Kim et H. Iwassaki. 1991. «Role of human cytochrome P-450IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspect». *Chem Res Toxicol*, vol. 4, p. 168-179.
- Haddad, S., G. Charest-Tardif, R. Tardif et K. Krishnan. 2000. «Validation of a physiological modeling framework for simulating the toxicokinetics of chemicals in mixtures». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 167, p. 199-209.
- Haghdoust, N. R., L. M. Newman et E. M. Johnson. 1997. «Multiple chemical exposures: Synergism vs. individual exposure levels». *Reprod Toxicol*, vol. 11, no 1, p. 9-27.

- Hamman, M. A., G. A. Thompson et S. D. Hall. 1997. «Regioselective and stereoselective metabolism of ibuprofen by human cytochrome P450 2C». *Biochem. Pharmacol.*, vol. 54, no 1, p. 33–41.
- Handsfield, H. H., H. Clark, J. F. Wallace, K. K. Holmes et M. Turck. 1973. «Amoxicillin, a new penicillin antibiotic». *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 3, no 2, p. 262–265.
- Hariton, C., L. Ciesielski, S. Simler, M. Valli, G. Jadot, S. Gobaille, E. Mesdjian et P. Mandel. 1984. «Distribution of sodium valproate and GABA metabolism in CNS of the rat». *Biopharm Drug Dispos*, vol. 5, no 4, p. 409–414.
- Hathaway, D. E. 1980. «Consideration of the evidence for mechanisms of 1, 2-trichloroethylene metabolism, including new identification of its dichloroacetic and trichloroacetic acid metabolites in mice». *Cancer. Lett.*, vol. 8, p. 263–269.
- Heading, R. C., J. Nimmo, L. F. Prescott et P. Tothill. 1973. «The dependence of paracetamol absorption on the rate of gastric emptying». *Br J Pharmacol*, vol. 47, no 2, p. 415–421.
- Health Canada (2005). Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Supporting Documentation–Trichloroethylene. Healthy Environments and Consumer Safety Branch Water Quality and Health Bureau. Health Canada, Ottawa, Ontario
- Henschler, D., W. Romen, H.M. Elsasser, D. Reichert, E. Eder et Z. Radwan. 1980. «Carcinogenicity study of trichloroethylene by longterm inhalation in three animal species». *Arch Toxicol*, vol. 43, p. 237–248.
- Herren-Freund, S. L., Pereira M. A., M. D. Khoury et G. Olson. 1987. «The carcinogenicity of trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetic acid and dichloroacetic acid, in mouse liver». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 90, p. 183–189.

Ho, Y.-S., H.-Y. Ma, H.-Y. Chang, B.-L. Wei, C.-C. Lee, S.-Y. Ho, H.-R. Guo, T.-P. Wu, W.-H. Chang et Y.-J Wang. 2003. «Lipid peroxidation and cell death mechanisms in rats and human cells induced by chloral hydrate». *Food Chem. Toxicol.*, vol. 4, p. 621–629.

<http://www.chemspider.com>.

<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00788>.

<http://www.drugs.com/pro/naproxen.html>.

Hughey, R., B. Rankin, J. Elce et N. P. Curthoys. 1978. «Specificity of a particulate rat renal peptidase and its localization along with other enzymes of mercapturic acid synthesis». *Arch Biochem Biophys*, vol. 168, p. 211–217.

Hunt, C. M., P. B. Watkins, P. Saenger, G. M. Stave, N. Barlascini, C.O. Watlington, J. T. Jr. Wright et P. S. Guzelian. 1992. «Heterogeneity of CYP3A isoforms metabolizing erythromycin and cortisol». *Clin Pharmacol Ther*, vol. 51, no 1, p. 18–23.

Huschek, G., P. D. Hansen, H. H. Maurer, D. Krengel et A. Kayser. 2004. «Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to European Commission recommendations». *Environ Toxicol*, vol. 19, no 3, p. 226–240.

Hussein, Z., D. Mukherjee, J. Lamm, J. H. Cavanaugh et G. R. Granneman. 1994. «Pharmacokinetics of valproate after multiple-dose oral and intravenous infusion administration: gastrointestinal-related diurnal variation». *J Clin Pharmacol*, vol. 34, p. 754–759.

Hutt, A. J., J. Caldwell et R. L. Smith. 1986. «The metabolism of aspirin in man: a population study». *Xenobiotica*, vol. 16, no 3, p. 239–249.

IARC. 1979. «Some Halogenated Hydrocarbons». Dans *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*.

- ICIS, Institut canadien d'information sur la santé (2000). Les soins de santé au Canada : un premier rapport annuel. Statistique Canada. Ottawa: 76 p
- Ikeda, M. 1974. «Reciprocal metabolic inhibition of toluene and trichloroethylene *in vivo* and *in vitro*». *Int Arch Arbeitsmed*, vol. 33, p. 125–130.
- Ikeda, M., Y. Miyake, M. Ogata et S. Ohmori. 1980. «Metabolism of trichloroethylene». *Biochem Pharmacol*, vol. 29, p. 2983–2992.
- Imbriani, M., Q. Niu, S. Negri et S. Ghittori. 2001. «Trichloroethylene in urine as biological exposure index». *Ind Health*, vol. 39, no 3, p. 225–230.
- IMS Health (2008). Tracking 13 key global pharma markets, 12 months to december 2006. IMS retail drug monitoring. IMS Health. London, U.K.
- INRS, Institut national de recherche et de sécurité (2002). Trichloroéthylène. Fiche toxicologique no 22. Paris
- Insel, P. A. 1999. «Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout». Dans *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, p. 617–657. New York: McGraw-Hill.
- Itoh, H., T. Nagano, T. Hayashi et M. Takeyama. 2000. «Ranitidine increases bioavailability of acetaminophen by inhibiting first-pass glucuronidation in man». *Pharm Pharmacol Commun*, vol. 6, p. 495–500.
- Jadhav, S. H., S. N. Sarkar, M. Aggarwal et H. C. Tripathi. 2007. «Induction of oxidative stress in erythrocytes of male rats subchronically exposed to a mixture of eight metals found as groundwater contaminants in different parts of India». *Arch Environ Contam Toxicol*, vol. 52, p. 145–151.
- James, W. R. L. 1963. «Fatal addiction to trichloroethylene». *Br J Ind Med*, vol. 20, p. 47–49.

- Johnson, P. D., S. Goldberg, M. Mays et B. V. Dawson. 2003. «Threshold of trichloroethylene contamination in maternal drinking waters affecting fetal heart development in the rat». *Environ Health Perspect*, vol. 111, no 3, p. 289–292.
- Jones, O. A. H., N. Voulvoulis et J. N. Lester. 2002. «Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals». *Water Res*, vol. 36, no 20, p. 5013–5022.
- Josting, D., D. Winne et K. W. Bock. 1976. «Glucuronidation of paracetamol, morphine and 1-naphthol in the rat intestinal loop». *Biochem Pharmacol*, vol. 25, no 5, p. 613–616.
- Kalow, W. 1962. *Pharmacogenetics: Heredity and the Response to drugs*. Philadelphia: W. B. Sanders, 232 p.
- Kalow, W. 1992. *Pharmacogenetics of drug metabolism*, 1. New York: Pergamon Press, 897 p.
- Keil, D. E., M. M. Peden-Adams, S. Wallace, P. Ruiz et G. S. Gilkeson. 2009. «Assessment of trichloroethylene (TCE) exposure in murine strains genetically-prone and non-prone to develop autoimmune disease». *J Environ Sci Health A Environ Sci Eng Toxic*, vol. 44, no 5, p. 443–453.
- Kerr, B. M., K. E. Thummel, C. J. Wurden, S. M. Klein, D. L. Kroetz, F. J. Gonzalez et R. H. Levy. 1994. «Human liver carbamazepine metabolism. Role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10, 11-epoxide formation». *Biochem Pharmacol*, vol. 47, p. 1969–1070.
- Kessova, I., et A. I. Cederbaum. 2003. «CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury». *Curr Mol Med*, vol. 3, no 6, p. 509–518.



- Khan, A. K. A., D. T. Howes, J. Piris et S. C Truelove. 1980. «Optimum dose of sulphasalazine for maintenance treatment in ulcerative colitis». *Gut*, vol. 21, no 3, p. 232–240.
- Khan, S. J., et J. E. Ongerth. 2004. «Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations». *Chemosphere*, vol. 54, no 3, p. 355–367.
- Kiang, T. K., P. C. Ho, M. R. Anari, V. Tong, F. S. Abbott et T. K. Chang. 2006. «Contribution of CYP2C9, CYP2A6, and CYP2B6 to valproic acid metabolism in hepatic microsomes from individuals with the CYP2C9\* 1/\* 1 genotype». *Toxicol Sci*, vol. 94, no 2, p. 261–271.
- Kiang, T. K. L., M. H. H. Ensom et T. K. H. Chang. 2005. «UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug–drug interactions». *Pharmacol Ther*, vol. 106, p. 97–132.
- Kirchheiner, J., I. Meineke, N. Steinbach, C. Meisel, I. Roots et J. Brockmoller. 2003. «Pharmacokinetics of diclofenac and inhibition of cyclooxygenases 1 and 2: no relationship to the CYP 2C9 genetic polymorphism in humans». *Br J Clin Pharmacol*, vol. 55, p. 51–61.
- Kleinfeld, M., et I. R. Tabershaw. 1954. «Trichloroethylene toxicity: report of five fatal cases». *Arch Ind Hyg Occup Med*, vol. 10, p. 134–141.
- Klotz, U., et K. H Antonin. 1977. «Pharmacokinetics and Bioavailability of Sodium Valproate». *Clin Pharmacol Ther*, vol. 21, p. 736–743.
- Kragh–Hansen, U. 1990. «Structure and ligand binding properties of human serum albumin». *Dan Med Bull*, vol. 37, no 1, p. 57–84.
- Krentz, A. J., et C. J. Bailey. 2005. «Oral antidiabetic agents». *Drugs*, vol. 65, no 3, p. 385–411.

- Krishnan, K., M. E. Andersen, H. J. Clewell et R. S. H. Yang. 1994a. «Physiologically based pharmacokinetic modeling of chemical mixtures». Dans *Toxicology of chemical mixtures: case studies, mechanisms, and novel approaches*, p. 399–437. San Diego, CA: Academic Press.
- Krishnan, K., et J. Brodeur. 1991. «Toxicological consequences of combined exposure to environmental pollutants». *Arch Compl Environ Stud*, vol. 3, p. 101–106.
- Krishnan, K., et J. Brodeur. 1994. «Toxic interactions among environmental pollutants: corroborating laboratory observations with human experience». *Environ Health Perspect*, vol. 102, no Suppl 9, p. 11.
- Krishnan, K., H. J. III. Clewell et M. E. Etersen. 1994b. «Physiologically based pharmacokinetic analysis of simple mixtures». *Environ Health Perspect*, vol. 102, p. 151–155.
- Kroboth, P. D., A. Brown, J. A. Lyon, F. J. Kroboth et R. P. Juhl. 1982. «Pharmacokinetics of single-dose erythromycin in normal and alcoholic liver disease subjects». *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 21, no 1, p. 135–140.
- Kuney, J. H. (1986). *Chemcyclopedia*. Washington, DC., American Chemical Society. 5: 116 p
- Kyle, M. E. M., et J. J. Kocsis. 1986. «Salicylate metabolism: effects of age and sex in adults». *Clin Pharmacol Ther*, vol. 39, p. 571–576.
- Landsdorp, D., T. B. Vree, T. J. Janseen et P. J. M. Guelen. 1990. «Pharmacokinetics of rectal diclofenac and its hydroxyl metabolites in man». *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, vol. 28, no 7, p. 298–302.
- Lash, L. H., J. W. Fisher, J. C. Lipscomb et J. C. Parker. 2000a. «Metabolism of trichloroethylene». *Environ. Health Perspect.*, vol. 108, p. 177–200.

- Lash, L. H., S. E. Hueni et D. A. Putt. 2001. «Apoptosis, necrosis and cell proliferation induced by S-(1, 2-dichlorovinyl)-L-cysteine in primary cultures of human proximal tubular cells». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 177, p. 1–16.
- Lash, L. H., J. C. Parker et C. Scott. 2000b. «Modes of action of trichloroethylene for kidney tumorigenesis». *Environ Health Perspect*, vol. 108, p. 225–240.
- Lash, L. H., D. A. Putt et J. C. Parker. 2006. «Metabolism and tissue distribution of orally administered trichloroethylene in male and female rats: identification of glutathione- and cytochrome P-450-derived metabolites in liver, kidney, blood, and urine». *J Toxicol Environ Health*, vol. 69, p. 1285–1309.
- Leem, Les entreprises du médicament en france (2012). Bilan économique. Édition 2013
- Leeman, T. D., C. Transon, P. Bonnabry et P. Dayer. 1993. «A major role for cytochrome P450TB (CYP2C subfamily) in the actions of non-steroidal antiinflammatory drugs». *Drugs Exp Clin Res*, vol. 19, no 5, p. 189–195.
- Lefranc, F., P. Yeaton, J. Brothi et R. Kiss. 2006. «Cimetidine, an unexpected anti-tumor agent, and its potential for the treatment of glioblastoma (Review)». *Int J Oncol*, vol. 28, p. 1021–1030.
- Lertratanangkoon, K., et M. G. Horning. 1982. «Metabolism of carbamazepine». *Drug Metab Dispos*, vol. 10, p. 1–10.
- Leung, H.-W. 1991. «Development and utilization of physiologically based pharmacokinetic models for toxicological applications». *J Toxicol Environ Health*, vol. 32, no 3, p. 247–267.
- Levine, M., E. Y. Law, S. M. Betiera, T. K. Chang et G. D. Bellward. 1998. «In vivo cimetidine inhibits hepatic CYP2C6 and CYP2C11 but not CYP1A1 in adult male rats». *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 284, p. 493–499.

- Levy, R. H., et K. M. Koch. 1982. «Drug interactions with valproic acid». *Drugs*, vol. 24, no 6, p. 543–556.
- Li, A. P. 2007. «Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development». *Chem Biol Interact*, vol. 168, no 1, p. 16–29.
- Li, A. P., P. D. Gorycki, J. G. Hengstler, G. L. Kedderis, H. G. Koebe, R. Rahmani, G. de Sousas, J. M. Silva et P. Skett. 1999. «Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel.». *Chem Biol Interact*, vol. 121, no 1, p. 117–123.
- Lipscomb, J. C., C. M. Garrett et J. E. Snawder. 1997. «Cytochrome P450–dependent metabolism of trichloroethylene: interindividual differences in humans». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 142, p. 311–318.
- Lipscomb, J. C., C. M. Garrett et J. E. Snawder. 1998. «Use of kinetic and mechanistic data in species extrapolation of bioactivation: cytochrome P–450 dependent trichloroethylene metabolism at occupationally relevant concentrations». *J Occup Health*, vol. 40, p. 110–117.
- Lipscomb, J. C., D. A. Mahle, W. T. Brashear et C. M. Garrett. 1996. «A species comparison of chloral hydrate metabolism in blood and liver». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 227, p. 340–350.
- Lloyd, J. W., R. M. Moore et B. P. Jr. 1975. «Background information on trichloroethylene». *J Occup Med*, vol. 17, p. 603–605.
- Lock, E. A., et W. O. Berndt. 1988. «Studies on the mechanism of nephrotoxicity and nephrocarcinogenicity of halogenated alkenes». *Crit Rev Toxicol*, vol. 19, no 1, p. 23–42.
- Löscher, W. 1999. «Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action». *Prog Neurobiol*, vol. 58, no 1, p. 31–59.

- Lu, Y., et A. I. Cederbaum. 2008. «CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol». *Free Radical Biol Med*, vol. 44, no 5, p. 723–738.
- Lumpkin, M., Dallas, C., Bruckner, J., and Fisher, J.A . 2002. «Physiologically based pharmacokinetic model of trichloroethylene incorporating binding in plasma of mice, rats, and humans». *Risk analysis*, vol. 5, p. 105–115.
- MacDonald, R. L., et R. W. Olsen. 1994. «GABA a receptor channels». *Annu Rev Neurosci*, vol. 17, p. 569–602.
- Maltoni, C., G. Lefemine, G. Cotti et G. Perino. 1986. «Long-term carcinogenicity bioassays on trichloroethylene administered by inhalation to Sprague-Dawley rats and Swiss and B6C3F1 mice.». *Ann NY Acad Sci*, vol. 534, p. 316–342.
- Mannsville (1992). Chemical product synopsis: trichloroethylene. Cortland, NY: Mannsville, Chemical Products Corp
- Manyike, P. T., E. D. Kharasch, T. F. Kalhorn et J. T. Slattery. 2000. «Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation». *Clin Pharmacol Ther*, vol. 67, p. 275–282.
- Masubuchi, Y., T. Nakano, A. Ose et T. Horie. 2001. «Differential selectivity in carbamazepine induced inactivation of cytochrome P450 enzymes in rat and human liver». *Arch Toxicol*, vol. 75, p. 538–543.
- McCarthy, T. B., et R. D. Jones. 1983. «Industrial gassing poisonings due to trichloroethylene, perchloroethylene, and 1, 1, 1-trichloroethane, 1961–80». *Br. J. Ind. Med.*, vol. 40, p. 450–455.
- McGurk, K. A., C. H. Brierley et B. Burchell. 1998. «Drug glucuronidation by human renal UDP-glucuronosyltransferases». *Biochem Pharmacol*, vol. 55, p. 1005–1012.



- McGurk, K. A., R. P. Remmel, V. P. Hosagrahara, D. Tosh et B. Burchell. 1996. «Reactivity of mefenamic acid 1-O-acyl glucuronide with proteins in vitro and ex vivo». *Drug Metab Dispos*, vol. 24, no 8, p. 842–849.
- McNeill, Jr. W. C. (1979). Trichloroethylene. Encyclopedia of chemical technology. Kirk-Othmer. New York, John Wiley and Sons. 24: 745–753 p
- Mehl, B., et J. P. Santell. 1999. «Projecting future drug expenditures–1999». *Am J Health–Syst Pharm*, vol. 56, p. 31–39.
- Meijer, D., et P. Van der Sluijs. 1989. «Covalent and noncovalent protein binding of drugs: implications for hepatic clearance, storage, and cells-specific drug delivery». *Pharm Res*, vol. 6, p. 105–118.
- Mesdjian, E., E. SCree, B. Charvet, A. Mirrione, V. Bourgarel–Re, A. Desobr et Y. Barra. 1999. «Metabolism of carbamazepine by CYP3A6: a model for *in vitro* drug interactions studies». *Life Sci*, vol. 64, no 10, p. 827–835.
- Michaud, V., et J. Turgeon. 2002. «Les cytochromes P450 et leur rôle clinique». *Le médecin du Québec*, vol. 37, no 8, p. 73–84.
- Miller, R. E., et F. P. Guengerich. 1983. «Metabolism of trichloroethylene in isolated hepatocytes, microsomes, and reconstituted enzyme systems containing cytochrome P–450». *Cancer Res*, vol. 43, p. 1145–1155.
- Miller, R., et T. M. Ludden. 1993. «Bioavailability of controlled release carbamazepine estimated by mixed effect modelling». *Eur J Clin Pharmacol*, vol. 44, p. 231–235.
- Mitchell, J. R., R. J. McMurtry, C. N. Statham et S. D. Nelson. 1977. «Molecular basis for several drug-induced nephropathies». *Am J Med*, vol. 62, no 4, p. 518–526.



- Mojaverian, P., M. L. Jr. Rocci, D. P. Conner, W. B. Abrams et P. H. Vlasses. 1987. «Effect of food on the absorption of enteric-coated aspirin: correlation with gastric residence time». *Clin Pharmacol Ther*, vol. 41, no 1, p. 11–17.
- Monster, A. C. 1979. «Difference in uptake, elimination, and metabolism in exposure to trichloroethylene, 1, 1, 1-trichloroethane and tetrachloroethylene». *Int Arch Occup Environ Health*, vol. 42, no 3–4, p. 311–317.
- Monster, A. C., G. Boersma et W. C. Duba. 1976. «Pharmacokinetics of trichloroethylene in volunteers: Influence of workload and exposure concentration». *Int Arch Occup Environ Health*, vol. 38, p. 87–102.
- Monster, A. C., G. Boersma et W. C. Duba. 1979. «Kinetics of trichloroethylene in repeated exposure of volunteers». *Int Arch Occup Environ Health*, vol. 42, no 3–4, p. 283–292.
- Monster, A. C., et J. F. Smolders. 1984. «Tetrachloroethene in exhaled air of persons living near pollution sources». *Int Arch Occup Environ Health*, vol. 53, no 4, p. 331–336.
- Morichau-Beauchant, M., G. Houin, P. Mavie, C. Alexandre et D. Dhumeaux. 1986. «Pharmacokinetics and bioavailability of ranitidine in normal subjects and cirrhotic patients». *Dig Dis Sci*, vol. 31, no 2, p. 113–118.
- Mroszczak, E., J.P. Yee et L. Bynum. 1988. «Absorption of naproxen controlled-release tablets in fasting and postprandial volunteers». *J Clin Pharmacol*, vol. 28, p. 1128–1131.
- Mulato, A. S. , E. S. Ho et T. Cihlar. 2000. «Nonsteroidal anti-inflammatory drugs efficiently reduce the transport and cytotoxicity of adefovir mediated by the human renal organic anion transporter 1». *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 295, no 1, p. 5–10.
- Muller, G., M. Spassovski et D. Henschler. 1972. «Trichloroethylene exposure and trichloroethylene metabolites in urine and blood». *Arch Toxicol*, vol. 29, p. 335–340.

- Mura, P. 2011. «Petit manuel de Pharmacovigilance et Pharmacologie clinique». *La revue Prescrire*, vol. 31, no 338, p. 437.
- Nakajima, T., T. Okino, S. Okuyama, T. Kaneko, I. Yonekura et A. Sato. 1988. «Ethanol-induced enhancement of trichloroethylene metabolism and hepatotoxicity: Difference from the effect of phenobarbital». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 94, p. 227–237.
- Nakajima, T., R. S. Wang, E. Elovaara, S. S. Park, H. V. Gelboin et H. Vainio. 1992a. «A comparative study on the contribution of cytochrome P450 isozymes to metabolism of benzene, toluene and trichloroethylene in rat liver». *Biochem Pharmacol*, vol. 43, p. 251–257.
- Nakajima, T., R. S. Wang, Y. Katakura, R. Kishi, E. Elovaara, S. S. Park, H. V. Gelboin et Vainio H. 1992b. «Sex-, age- and pregnancy-induced changes in the metabolism of toluene and trichloroethylene in rat liver in relation to the regulation of cytochrome P450IIE1 and P450IIC11 content». *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 261, no 3, p. 869–874.
- NCI, National Cancer Institute (1976). Carcinogenesis bioassay of trichloroethylene (CAS No. 79–01–6). Carcinogenesis Program Division of Cancer Cause and Prevention, Carcinogen Bioassay and Program Resources Branch. Bethesda, MD. (NIH) 76–802
- Needs, C. J., et P. M. Brooks. 1985. «Clinical pharmacokinetics of the salicylates». *Clin Pharmacokinet*, vol. 10, p. 164–177.
- Nelson, D. L., et M. M. Cox. 2004. «Enzymes». Dans *Lehninger principles of biochemistry*, p. 191–225. New work: W. H. Freeman & Company.
- Nelson, S. D. 1990. *Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen: Seminars in liver disease*. 267 p.

- Neuvonen, P. J., et K. T. Kivisto. 1988. «Effect of magnesium hydroxide on the absorption of tolfenamic and mefenamic acids». *Eur J Clin Pharmacol*, vol. 35, p. 495–501.
- Niazi, S. K., S. M. Alam et S. I. Ahmad. 1996. «Dose dependent pharmacokinetics of naproxen in man». *Biopharm Drug Dispos*, vol. 17, no 4, p. 355–361.
- NTP, National Toxicology Program (1988). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Trichloroethylene (CAS No. 79–01–6) in Four Strains of Rats (ACI, August, Marshall, Osborne–Mendel) (Gavage Studies) PB88–218896, Technical Report 273. Research Triangle Park, NC
- Obaid, R., O. Ali, Z. S. Saify, N. Kamil, M. H. Khan, T. Ahmed et S. W. Ahmed. 2004. «Pharmacokinetic differences of some generic tablet Gliclazide 80 mg on Pakistani population». *Pak J Pharm Sci*, vol. 17, no 1, p. 55–64.
- Ogata, M., et T. Saeki. 1974. «Measurement of chloral hydrate, trichloroethanol, trichloroacetic acid and monochloroacetic acid in the serum and the urine by gas chromatography». *Int Arch Arbeitsmed*, vol. 33, p. 49–58.
- Ogata, M., K. Tomokuni et H. Asahar. 1974. «Simple microdetermination of trichloroethanol glucuronide and trichloroacetic acid in urine». *Int Arch Arbeitmed*, vol. 32, p. 203–215.
- Oida, T., K. Yoshida, A. Kagemoto, Y. Sekine et T. Higashijima. 1985. «The metabolism of gliclazide in man». *Xenobiotica*, vol. 15, no 1, p. 87–96.
- OMS, Organisation mondiale de la sante (1990). La situation pharmaceutique dans le monde. Genève, Suisse
- Owens, M. J., et C. B. Nemeroff. 2003. «Pharmacology of valproate». *Psychopharmacol Bull*, vol. 37, no 2, p. 17–24.
- Palmer, K. J., et R. N. Brogden. 1993. «Gliclazide». *Drugs*, vol. 46, no 1, p. 92–125.

- Park, J.Y., K.A. Kim, P.W. Park, C.W. Park et J.G. Shin. 2003. «Effect of rifampin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of gliclazide». *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 74, p. 334–340.
- Patel, D. K., A. Hesse, A. Ogunbona, L. J. Notarianni et P. N. Bennett. 1990. «Metabolism of aspirin after therapeutic and toxic doses». *Hum Exp Toxicol*, vol. 9, no 3, p. 131–136.
- Patel, M., B. K. Tang et W. Kalow. 1992. «Variability of acetaminophen metabolism in Caucasians and Orientals». *Pharmacogenetics*, vol. 2, no 1, p. 38–45.
- Pelekis, M., et K. Krishnan. 1997. «Assessing the relevance of rodent data on chemical interactions for health risk assessment purposes: a case study with dichloromethane–toluene mixture». *Regul Toxicol Pharm*, vol. 25, p. 79–86.
- Pelkonen, O., A. R. Boobis, P. Kremers, M. Ingelman–Sundberg et Rane A. 2001a. «Interindividual variation of P450 enzymes *in vitro* and its causes». Dans *Interindividual variability in human drug metabolism*, G. M. In Pacifici et O. Pelkonen, p. 269–332. London and New York: Taylor & Francis.
- Pelkonen, O., P. Myllynen, P. Taavitsainen, A. R. Boobis, P. Watts, B. G. Lake, R. J. Price, A. B. Renwick, M.-J. Gómez–Lechón, J. V. Castell, M. Ingelman–Sundberg, M. Hidestrand, A. Guillouzo, L. Corcos, P. S. Goldfarb et D. F. V. Lewis. 2001b. «Carbamazepine: a 'blind' assessment of CYP associated metabolism and interactions in human liver–derived *in vitro* systems». *Xenobiotica*, vol. 6, p. 321–343.
- Peppercorn, M. A., et P. Goldman. 1972. «The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine». *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 181, no 3, p. 555–562.
- Pereira, M. A. 1996. «Carcinogenic activity of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid in the liver of female B6C3F1 mice». *Fundam Appl Toxicol*, vol. 31, no 2, p. 192–199.

- Perucca, E. 2002. «Pharmacological and therapeutic properties of valproate». *CNS drugs*, vol. 16, no 10, p. 695–714.
- Plewka, A., B. Zielińska-Psuj, J. Kowalówka-Zawieja, G. Nowaczyk-Dura, D. Plewka, A. Wiaderkiewicz, M. Kamiński et J. Orłowski. 2000. «Influence of acetaminophen and trichloroethylene on liver cytochrome P450-dependent monooxygenase system». *Acta. Biochim. Pol.*, vol. 47, p. 1129–1136.
- Porter, R. J., et B. S. Meldrum. 2001. «Antiseizure drugs». Dans *Basic & Clinical Pharmacology*, p. 395–418. New York: McGraw-Hill.
- Poulin, P., et S. Haddad. 2011. «Microsome composition-based model as a mechanistic tool to predict nonspecific binding of drugs in liver microsomes». *J Pharm Sci*, vol. 100, no 10, p. 4501–4517.
- Prandota, J., J. P. Tillement, P. d'Athis, H. Campos et J. Barre. 1980. «Binding of erythromycin base to human plasma proteins». *J Int Med Res*, vol. 8, no 2, p. 1–8.
- Prescott, L. F. 1974. «Gastrointestinal absorption of drugs». *Med Clin North Am*, vol. 58, no 5, p. 907–916.
- Prescott, L. F. 1983. «Paracetamol overdose». *Drugs*, vol. 25, no 3, p. 290–314.
- R. A. Clewell, et H. J. Clewell. 2008. «Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment». *Regul Toxicol Pharmacol*, vol. 50, no 1, p. 129–143.
- Raaschou-Nielsen, O., J. Hansen, J. K. McLaughlin, H. Kolstad, J. M. Christensen, R. E. Tarone et J. H. Olsen. 2003. «Cancer risk among workers at Danish companies using trichloroethylene: a cohort study». *Am J Epidemiol*, vol. 158, no 12, p. 1182–1192.
- Rauncy, J. L., J. C. Kramer et J. M. Lasker. 1993. «Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P4502E1». *Crit Rev Toxicol*, vol. 23, p. 1–20.

- Rawlins, M. D., D. B. Henderson et A. R. Hijab. 1977. «Pharmacokinetics of paracetamol (acetaminophen) after intravenous and oral administration». *Eur J Clin Pharmacol*, vol. 11, no 4, p. 283–286.
- Reynolds, J. E. F. (1993). Martindale, The Extra Pharmacopoeia. The Pharmaceutical Press. London: 1310 p
- Riess, W., H. Stierlin, P. Degen, J. W. Faigle, A. Gérardin, J. Moppert, A. R. Sallmann, K. Schmid, A. Schweizer, M. Sulc, W. Theobald et J. Wagner. 1978. «Pharmacokinetics and metabolism of the anti-inflammatory agent Voltaren». *Scand J Rheumatol Suppl*, vol. 22, p. 17–29.
- Rogers, C. J., R. E. Twyman et R. L. Macdonald. 1994. «Benzodiazepine and beta-carboline regulation of single GABAA receptor channels of mouse spinal neurones in culture». *J Physiol*, vol. 475, p. 69–82.
- Sadeque, A. J. M., M. B. Fisher, K. R. Korzekwa, F. J. Gonzalez et A. E. Rettie. 1997. «Human CYP2C9 and CYP2A6 mediate formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid». *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 283, p. 698–703.
- Said, S. A., et A. A. Sharaf. 1981. «Pharmacokinetics of diclofenac sodium using a developed HPLC method». *Arzneim.-Forsch*, vol. 31, no 12, p. 2089–2092.
- Sallmann, A. R. 1986. «The history of diclofenac». *Am J Med*, vol. 80, no 4B, p. 29–33.
- Santé Canada (2004). Le trichloroéthylène dans l'eau potable, document publié à des fins de commentaires par le public. Le Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable. Ottawa, Ontario
- Santé Canada (2005). Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : Documentation à l'appui—Le trichloroéthylène. Bureau de la qualité de l'eau et de la santé. Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs. Ottawa, Ontario: 60 p



- Sato, A., et T. Nakajima. 1978. «Differences following skin or inhalation exposure in the absorption and excretion kinetics of trichloroethylene and toluene». *Br J Ind Med*, vol. 35, no 1, p. 43–49.
- Sato, A., T. Nakajima, Y. Fujiwara et N. Murayama. 1977. «A pharmacokinetic model to study the excretion of trichloroethylene and its metabolites after an inhalation exposure». *Br J Ind Med*, vol. 34, no 1, p. 56–63.
- Schaumburg, F. 1990. «Banning trichloroethylene: responsible reaction or overkill?». *Environ Sci Technol*, vol. 24, no 1, p. 17–22.
- Schentag, J. J., et C. H. Ballow. 1991. «Tissue-directed pharmacokinetics». *Am J Med*, vol. 91, no 3, p. S5–S11.
- Schroder, H., et D. E. S. Campbell. 1972. «Absorption metabolism and excretion of salicylazosulphapyridine in man». *Clin Pharmac Ther*, vol. 13, p. 539–551.
- Schwarzenbach, R. P., W. Giger, E. Hoehn et J. K. Schneider. 1983. «Behavior of organic compounds during infiltration of river water to groundwater. Field studies». *Environ Sci Technol*, vol. 17, no 8, p. 472–479.
- Sevelius, H., R. Runkel, E. Segre et S. S. Bloomfield. 1980. «Bioavailability of naproxen sodium and its relationship to clinical analgesic effects». *Br J Clin Pharmacol*, vol. 10, no 3, p. 259–263.
- Shitara, Y., D. Sugiyama, H. Kusuhara, Y. Kato, T. Abe, P. J. Meier, T. Itoh et Y. Sugiyama. 2002. «Comparative inhibitory effects of different compounds on rat oatpl (slc21a1)– and Oatp2 (Slc21a5)–mediated transport». *Pharm Res*, vol. 2, p. 147–153.
- Shorvon, S. D. 1990. «Epidemiology, classification, natural history, and genetics of epilepsy». *The Lancet*, vol. 336, no 8707, p. 93–96.

- Silva, M. F. B., C. C. P. Aires, P.B. M. Luis, J. P. N. Ruiter, L. Ijlst, M. Duran, R. J. A. Wanders et I. T. de Almeida. 2008. «Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review». *J Inherit Metab Dis*, vol. 31, no 2, p. 205–216.
- Small, R. E. 1989. «Diclofenac sodium». *Clin Pharm*, vol. 8, no 8, p. 545–558.
- Smith, G. F. 1966. «Trichloroethylene: a review». *Br J Ind Med*, vol. 23, p. 249–262.
- Smyth, R. D., M. Pfeffer, D. R. Van Harken, A. Cohen et G. H. Hottendorf. 1981. «Human pharmacokinetics and disposition of sarmoxicillin, a lipophilic amoxicillin prodrug». *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 19, no 6, p. 1004–1012.
- Somogyi, A., et R. Gugler. 1983. «Clinical pharmacokinetics of cimetidine». *Clin Pharmacokinet*, vol. 8, no 6, p. 463–495.
- Spahn–Langguth, H., et L. Z. Benet. 1992. «Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism?». *Drug Metab Rev*, vol. 24, no 1, p. 5–47.
- Spiller, H. A., E. P. Krenzelok, W. Klein–Schwartz, M. L. Winter, J. A. Weber, D. R. Sollee, S. A. Bangh et J. R. Griffith. 2000. «Multicenter case series of valproic acid ingestion: serum concentrations and toxicity». *J Toxicol Clin Toxicol*, vol. 37, p. 755–760.
- Stijntes, G. J., J. M. Koppele et N. P. E. Vermueulen. 1992. «HPLC–fluorescence assay of the pyruvic acid to determine cysteine conjugate  $\beta$ –lyase activity». *Anal Biochem*, vol. 206, p. 334–343.
- Study, R. E., et J. L. Barker. 1981. «Diazepam and (—)–pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma–aminobutyric acid responses in cultured central neurons». *Proc Natl Acad Sci*, vol. 78, p. 7180–7184.

- Summers, R. W., D. M. Switz, J. T. Jr. Sessions, J. M. Beckett, W. R. Best, F. Jr. Kern et J. W. Singleton. 1979. «National Cooperative Crohn's Disease Study: results of drug treatment». *Gastroenterology*, vol. 77, no 2, p. 847–869.
- Sztajnkrzycki, M. D. 2002. «Valproic acid toxicity: overview and management». *J Toxicol Clin Toxicol*, vol. 40, no 6, p. 789–801.
- Szutowski, M. M., K. Zalewska, M. Jadczyk et M. Marek. 2002. «*In vivo* effect of diallyl sulfide and cimetidine on phenacetin metabolism and bioavailability in rat». *Acta Biochim Pol*, vol. 1, p. 249–256.
- Tall, A. R., et S. P. Mistilis. 1975. «Studies on Ponstan (mefenamic acid): I. Gastro-intestinal blood loss; II. Absorption and excretion of a new formulation». *J Int Med Res*, vol. 3, no 3, p. 176–182.
- Tardif, R., et G. Charest-Tardif. 1999. «The importance of measured end-points in demonstrating the occurrence of interactions: a case study with methylchloroform and m-xylene». *Toxicol Sci*, vol. 49, p. 312–317.
- Tardif, R., S. Lapare, G. Charest-Tardif, J. Brodeur et K. Krishnan. 1995. «Physiologically-based pharmacokinetic modeling of a mixture of toluene and xylene in humans». *Risk Anal*, vol. 15, p. 335–342.
- Tardif, R., S. Lapare, K. Krishnan et K. Brodeur. 1993. «Physiologically based modeling of the toxicokinetic interaction between toluene and m-xylene in the rat». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 120, p. 266–273.
- Tassaneeyakul, W., D. J. Birkett et J. O. Miners. 1998. «Inhibition of human hepatic cytochrome P4502E1 by azole antifungals, CNS-active drugs and nonsteroidal anti-inflammatory agents». *Xenobiotica*, vol. 3, p. 293–301.
- Taylor, A. R., R. D. Brownsill, H. Grandon, F. Lefoulon, A. Petit, W. Luijten, P. G. Kopelman et B. Walther. 1996. «Synthesis of putative metabolites and investigation of the metabolic fate of gliclazide, [1-(3-azabicyclo (3, 3, 0) oct-3-yl)-3-(4-methylphenylsulfonyl) urea], in diabetic patients». *Drug Metab Dispos*, vol. 24, no 1, p. 55–64.

- Thompson, P. J., K. R. Burgess et G. E. Marlin. 1980. «Influence of food on absorption of erythromycin ethyl succinate». *Antimicrob Agents Chemother.*, vol. 18, p. 829–831.
- Toothaker, R. D., S. H. Barker, M. V. Gillen, S. A. Helsinger, C. G. Kindberg, T. L. Hunt et J. H. Powell. 2000. «Absence of pharmacokinetic interaction between orally co-administered naproxen sodium and diphenhydramine hydrochloride». *Biopharm Drug Dispos*, vol. 21, no 6, p. 229–233.
- Traylor, P.S., W. Nastainczyk et V. Ullrich. 1977. «Conversion of trichloroethylene to carbon monoxide by microsomal cytochrome P-450». *Proceedings of the 3rd international symposium on microsomes and drug oxidations*, p. 615–621.
- US Environmental Protection Agency (EPA) (1985). Health Assessment Document for Trichloroethylene. Final Report. Washington, DC. 1985 Assessment
- US Environmental Protection Agency (EPA) (1992). Toxicologic Interaction Data Base (MIX-TOX). US EPA. Cincinnati
- US Environmental Protection Agency (EPA) (1997). Updated carcinogenicity assessment for trichloroethylene. Addendum to the health assessment document for trichloroethylene. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, D.C.
- US Environmental Protection Agency (EPA) (2001). Trichloroethylene Health Risk Assessment: Synthesis and Characterization (External review draft). EPA/600/P-01/002A. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC
- Vane, J. R. 1971. «Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs». *Nature*, vol. 231, no 25, p. 232–235.
- Vane, J. R., et R. M Botting. 1996. «Mechanism of Action of Anti-Inflammatory Drugs». *Informa Healthcare*, vol. 25, no 102, p. 9–21.

- Vane, J. R., et R. M. Botting. 1998. «Mechanism of action of anti-inflammatory drugs». *Int J Tissue React*, vol. 20, p. 3–15.
- Vermeulen, N. P. E., J. G. M. Bessems et R. Van de Straat. 1992. «Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention». *Drug Metab Rev*, vol. 24, no 3, p. 367–407.
- Verner, M. –A., T. Magher et S. Haddad. 2009. «High concentrations of commonly used drugs can inhibit the *in vitro* glucuronidation of bisphenol A and nonylphenol in rats». *Xenobiotica*, vol. 40, no 2, p. 1–10.
- Verschuieren, K. 1983. *Handbook of environmental data on organic chemicals*: Wiley & Sons, 1296 p.
- Viau, C., et R. Tardif. 2003. «Toxicologie». Dans *Environnement et santé publique – Fondements et pratiques*, p. 119–143. Acton Vale / Paris: Edisem Tec & Doc.
- Vorum, H. 1999. «Reversible ligand binding to human serum albumin. Theoretical and clinical aspects». *Dan Med Bull*, vol. 46, no 5, p. 379–399.
- Vyskocil, A., R. Tardif, J. Brodeur, M. Gérin, C. Viau, D. Drolet, F. Lemay, G. Truchon et G. Lapointe (2001). *Interactions toxicologiques en milieu de travail*. Montréal, Québec, Institut de recherche en santé et en sécurité du travail du Québec
- Warner, T. D., F. Giuliano, I. Vojnovic, A. Bukasa, J. A. Mitchell et J. R. Vane. 1999. «Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full *in vitro* analysis». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no 13, p. 7563–7568.
- Wartenberg, D., D. Reyner et C. S. Scott. 2000. «Trichloroethylene and cancer: epidemiologic evidence». *Environ Health Perspect*, vol. 108, p. 161–176.

- Watanabe, K., et F. Y. Bois. 1996. «Interspecies extrapolation of physiological pharmacokinetic parameter distributions». *Risk Anal*, vol. 16, p. 741–754.
- Welsch, F., G. M. Blumenthal et R. B. Conolly. 1995. «Physiologically based pharmacokinetic models applicable to organogenesis: extrapolation between species and potential use in prenatal toxicity risk assessments». *Toxicol Lett*, vol. 83, p. 539–547.
- Willis, J. V., M. J. Kendall, R. M. Flinn, D. P. Thornhill et P. G. Welling. 1979. «The Pharmacokinetics of diclofenac sodium following intravenous and oral administration». *Eur J Clin Pharmacol*, vol. 16, no 6, p. 405–410.
- Wright, J., F. Boudinot et M. Ujhelyi. 1996. «Measurement and analysis of unbound drug concentrations». *Clin Pharmacokinetic*, vol. 30, p. 445–462.
- Wrighton, S. A., et J. C. Stevens. 1992. «The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism». *Crit Rev Toxicol*, vol. 22, p. 1–21
- Wu, C., et J. Schaum. 2000. «Exposure assessment of trichloroethylene». *Environ Health Perspect*, vol. 108, no 2, p. 359–363.
- Wu, K. L., et T. Berger. 2007. «Trichloroethylene metabolism in the rat ovary reduces oocyte fertilizability». *Chem Biol Interact*, vol. 170, no 1, p. 20–30.
- Yamauchi, A., G. J. Stijntjes, J. N. M. Commeteur et N. P. E. Vermeulen. 1993. «Purification of glutamine transaminase K/cysteine conjugate  $\beta$ -lyase from rat renal cytosol based on hydrophobic interaction HPLC and gel permeation FPLC». *Protein Expression and Purif*, vol. 4, p. 552–562.
- Yang, R. S. H. (1994). *Toxicology of Chemical Mixtures. Case studies, mechanisms, and novel approaches*. R. S. H. Yang. San Diego, Academic Press: 720 p
- Yao, Y., W. –W. Han, Y. –H. Zhou, Z. –S. Li, Q. Li, X. –Y. Chen et D. –F. Zhong. 2009. «The metabolism of CYP2C9 and CYP2C19 for gliclazide by



homology modeling and docking study». *Eur J Med Chem*, vol. 44, no 2, p. 854–861.

Zhang, Y., D. Si, X. Chen, N. Lin, Y. Guo, H. Zhou et D. Zhong. 2007. «Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on pharmacokinetics of gliclazide MR in Chinese subjects». *Br J Clin Pharmacol*, vol. 64, p. 67–74.

Zielińska-Psuj, B., J. Orowski, A. Plewka, M. Kamiński et J. Kowalówka-Zawieja. 2001. «Metabolic interactions between acetylsalicylic acid, xylene and trichloroethylene in Rats». *Pol J Environ Stud*, vol. 1, p. 43–49.

Zielińska-Psuj, B., J. Orowski, A. Plewka, M. Kamiński, J. Kowalówka-Zawieja et B. Ziêba-Proc. 1999. «Metabolic interactions in rats treated with acetylsalicylic acid and trichloroethylene». *Pol J Environ Stud*, vol. 5, p. 319–325.